

**DELPHION**

Log Out	Work Files	Saved Searches	My Account
<b>The Delphion Integrated View: INPADOC Record</b>			
Get Now: <input checked="" type="checkbox"/> PDF   File History   Other choices View: Jump to: <a href="#">Top</a> <a href="#">Go to: Derwent</a>			
Tools: Add to Work File: <a href="#">Create new Work File</a> <input type="checkbox"/> Add <input type="checkbox"/> Email this to a friend			

Title: **CN1350591A: One step sample preparation and detection of nucleic acids in complex biological samples**

Derwent Title: One step sample preparation and detection of nucleic acids in samples using lysis buffers containing strong chaotropic agents and locked nucleic acid probes for hybridization [Derwent Record]

Country: **CN** China  
Kind: A Unexamined APPLIC. open to Public inspection ! (See also: [CN1350591T](#))  
Inventor: J. SKOUV; Denmark  
Assignee: EXIQON A/S Denmark  
News, Profiles, Stocks and More about this company

Published / Filed: 2002-05-22 / 2000-03-17  
Application Number: [CN20000000807333](#)  
IPC Code: IPC-7: [C07K 19/00](#); [C12Q 1/68](#);

ECLA Code: **C07K14/00B1**; [C12Q1/68A4+525/307+527/125+565/101](#); [C12Q1/68A4+537/125+537/101+527/125+527/101+](#); [C12Q1/68B2+525/307+527/125+565/101](#); [C12Q1/68B10A+525/307+527/125](#); [C12Q1/68B10A+525/307+527/125+](#);  
Priority Number: 1999-03-18 **DK1999000000384**

INPADOC Legal Status: None Get Now: Family Legal Status Report

Family:	Publication	Pub. Date	Filed	Title
	<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">WO00056920A1</a>	2000-09-28	2000-03-17	ONE STEP SAMPLE PREPARATION AND DETECTION OF NUCLEIC ACIDS IN COMPLEX BIOLOGICAL SAMPLES

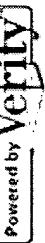
<input type="checkbox"/> <a href="#">US20030039974A1</a>	2003-02-27	2001-08-07	One step sample preparation and detection of nucleic acids in complex biological samples
<input type="checkbox"/> <a href="#">US6303315B1</a>	2001-10-16		
<input type="checkbox"/> <a href="#">US6303315</a>	2001-10-16	2000-03-18	One step sample preparation and detection of nucleic acids in complex biological samples
<input type="checkbox"/> <a href="#">JP2002539802T2</a>	2002-11-26	2000-03-17	
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">IL0145422A0</a>	2002-06-30	2000-03-17	ONE STEP SAMPLE PREPARATION AND DETECTION OF NUCLEIC ACIDS IN COMPLEX IN BIOLOGICAL SAMPLES
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">EP1161561B1</a>	2005-12-28	2000-03-17	ONE STEP SAMPLE PREPARATION AND DETECTION OF NUCLEIC ACIDS IN COMPLEX BIOLOGICAL SAMPLES
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">EP1161561A1</a>	2001-12-12	2000-03-17	ONE STEP SAMPLE PREPARATION AND DETECTION OF NUCLEIC ACIDS IN COMPLEX BIOLOGICAL SAMPLES
<a href="#">DE60025172C0</a>	2006-02-02	2000-03-17	EINSTUFIGE PROBEZUBEREITUNG UND BESTIMMUNG VON NUKELEINSÄURE IN BIOLOGISCHEN PROBEN
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">CN1350591T</a>	2002-05-22	2000-03-17	One step sample preparation and detection of nucleic acids in complex biological samples
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">CN1350591A</a>	2002-05-22	2000-03-17	One step sample preparation and detection of nucleic acids in complex biological samples
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">CA2366231AA</a>	2000-09-28	2000-03-17	ONE STEP SAMPLE PREPARATION AND DETECTION OF NUCLEIC ACIDS IN COMPLEX BIOLOGICAL SAMPLES
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">AU0032746A5</a>	2000-10-09	2000-03-17	One step sample preparation and detection of nucleic acids in complex biological samples

13 family members shown above

Other Abstract  
Info:



Nominate this for the Gallery...



THOMSON  
\* [www.thomson.com](http://www.thomson.com)

Copyright © 1997-2006 The Thomson Corporation  
[Subscriptions](#) | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact Us](#) | [Help](#)

## [12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 00807333.3

[43]公开日 2002年5月22日

[11]公开号 CN 1350591A

[22]申请日 2000.3.17 [21]申请号 00807333.3

[30]优先权

[32]1999.3.18 [33]DK [31]PA199900384

[86]国际申请 PCT/DK00/00128 2000.3.17

[87]国际公布 WO00/56920 英 2000.9.28

[85]进入国家阶段日期 2001.11.9

[71]申请人 埃克西库恩公司

地址 丹麦韦兹拜克

[72]发明人 J·斯科夫

[74]专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 程伟 彭益群

权利要求书6页 说明书42页 附图页数11页

[54]发明名称 以单一步骤制备和检测复合生物样品中的核酸

[57]摘要

本发明涉及一种用以使复杂的生物性样品在释出核酸的同时检测所叙述核酸的方法。本发明涉及使用含有强离液剂如硫氰酸胍的细胞溶解缓冲液以促进细胞溶解,释出细胞的核酸,本发明并涉及利用新形式的双环核苷酸类似物,锁定核酸(LNA)通过核酸杂交检测细胞溶解过程中释出的特异性的核酸。尤其是所描述的捕捉LNA-寡体的共价连接方法。也提出了样品制备例如聚腺苷酸化的mRNA的新方法。本发明更进一步提出用于该方法的试剂及该方法的应用。

ISSN1008-4274

## 权 利 要 求 书

1. 分离靶核酸的方法，该方法包括：
  - a 提供含核酸的样品，
  - b 用含有离液剂的细胞溶解缓冲液处理将该样品，溶解样品中的细胞物质，分解其成分并使样品内的核酸变性，
  - c 使自样品释出的核酸与至少一种捕捉 LNA-探针接触，所述捕捉探针与靶核酸实质上互补。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其中该捕捉 LNA-探针以共价方式连接至配体。
3. 如权利要求 1 所述的方法，其中该捕捉 LNA-探针以共价方式连接至一固体表面。
4. 如权利要求 2 所述的方法，其中以共价方式连接至 LNA-探针的配体偶合至一抗配体，该抗-配体以共价方式连接至固体表面。
5. 如权利要求 3 或 4 所述的方法，其中在自样品释出的核酸与连接至固体表面的 LNA 接触后，该固体表面与过量的物质分离开来。
6. 如权利要求 5 所述的方法，其中用缓冲液清洗该固体表面来去除过量的物质。
7. 如前所述的任意一项权利要求的方法，其中该捕捉探针与靶核酸互补。
8. 如前所述的任意一项权利要求的方法，其中该捕捉探针长度在 4 到 50 个核苷酸之间。
9. 如前所述的任意一项权利要求的方法，其中该捕捉探针长度在 8 到 30 个核苷酸之间。
10. 如前所述的任意一项权利要求的方法，其中该捕捉探针长度在 8 到 20 个核苷酸之间。
11. 如前所述的任意一项权利要求的方法，其中该捕捉探针长度在 8 到 15 个核苷酸之间。
12. 如前所述的任意一项权利要求的方法，其中使用一种以上的捕捉 LNA-探针，

该捕捉探针由直接抗不同靶核酸或同一核酸上的不同区域的不同的 LNA-寡聚物组成。

13. 如权利要求 12 所述的方法，其中不同的捕捉探针呈数组形式点状分布在固体表面上。
14. 如权利要求 13 所述的方法，其中该数组含有至少 10 个捕捉探针。
15. 如权利要求 13 所述的方法，其中该数组含有至少 100 个捕捉探针。
16. 如权利要求 13 所述的方法，其中该数组含有至少 1,000 个捕捉探针。
17. 如权利要求 13 所述的方法，其中该数组含有至少 10,000 个捕捉探针。
18. 如前所述的任意一项权利要求的方法，其中该核酸取由细胞，组织样品或组织提取物。
19. 如权利要求 18 所述的方法，其中该细胞来自古生物，原核生物或真核生物。
20. 如权利要求 18 所述的方法，其中该样品来自血液，血清，血浆，网状细胞，淋巴细胞，尿液，骨髓组织，脑脊髓液或任何由血液，淋巴，肌肉组织活组织检查，肝脏活组织检查，肾脏活组织检查，膀胱活组织检查，骨活组织检查，软骨活组织检查，皮肤活组织检查，胰脏活组织检查，肠道活组织检查，胸腺活组织检查，乳房活组织检查，子宫活组织检查，睾丸活组织检查，眼睛活组织检查，或脑活组织检查制备的产物，该样品均质于溶解缓冲液中。
21. 如前所述的任意一项权利要求的方法，其中该捕捉探针由直接抗一种或多种靶核酸的 LNA-寡聚物组成，该靶核酸对特种生物体有特异性。
22. 如前所述的任意一项权利要求的方法，其中该捕捉探针由直接抗一种或多种靶核酸的 LNA-寡聚物组成，该靶核酸对特种生物体，亚种生物体或生物体株有特异性。
23. 如前所述的任意一项权利要求的方法，其中该捕捉探针由直接抗一种或多种靶核酸的 LNA-寡聚物组成，该靶核酸对特种的微生物有特异性。
24. 如前所述的任意一项权利要求的方法，其中该捕捉探针由直接抗一种或多种靶

核酸的 LNA-寡聚物组成，该靶核酸对特种微生物，亚种微生物或微生物株有特异性。

25. 如前所述的任意一项权利要求的方法，其中该捕捉探针由直接抗一种或多种靶核酸的 LNA-寡聚物所组成，该靶核酸对易感染物有特异性。
26. 如前所述的任意一项权利要求的方法，其中该捕捉探针由直接抗一种或多种靶核酸的 LNA-寡聚物所组成，该靶核酸对特种感染物，亚种感染物或易感染物株有特异。
27. 如前所述的任意一项权利要求的方法，其中该捕捉探针由直接抗一种或多种靶核酸的 LNA-寡聚物所组成，该靶核酸对编码与遗传疾病有关的蛋白质基因有特异性。
28. 如前所述的任意一项权利要求的方法，其中该捕捉探针由直接抗一种或多种靶核酸的 LNA-寡聚物所组成，该靶核酸对与致死性疾病相关的基因有特异性。
29. 如前所述的任意一项权利要求的方法，其中该捕捉探针由直接抗一种或多种靶核酸的 LNA-寡聚物所组成，该靶核酸对与癌症相关的基因有特异性。
30. 如权利要求 28 所述的方法，其中该致死性疾病选自动脉硬化和糖尿病。
30. 如前所述的任意一项权利要求的方法，其中该固体表面选自玻璃，碳水化合物的聚合物和金属。
32. 如前所述的任意一项权利要求的方法，其中该固体表面为微量滴定板中井孔的壁。
33. 如前所述的任意一项权利要求的方法，其中该固体表面呈珠状。
34. 如前所述的任意一项权利要求的方法，其中该固体表面呈平板状。
35. 如前所述的任意一项权利要求的方法，其中该分离于一步完成。
36. 如权利要求 2 和 3 所述的方法，其中该配体为生物素。
37. 如前所述的任意一项权利要求的方法，其中通过检测探针检测杂交到捕捉探

针上的靶核酸。

38. 如权利要求 37 所述的方法，其中该检测探针用选自萤光团，放射性同位素，酶，配体及半抗原的和抗原化合物的标记来标识。
39. 如权利要求 38 所述的方法，其中该萤光团选自萤光黄，若丹明和德克萨斯红。
40. 如权利要求 38 所述的方法，其中该放射性同位素选自  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$  和  $^{14}\text{C}$ 。
41. 如权利要求 38 所述的方法，其中该酶选自辣根过氧化酶，碱性磷酸酶，小牛的肠酶，碱性磷酸酶，葡萄糖氧化酶和  $\beta$ -半乳糖苷酶。
42. 如权利要求 38 所述的方法，其中该配体选自生物素，甲状腺素和皮质醇。
43. 如权利要求 37 至 42 中任一所述的方法，其中该检测探针杂交至固定的靶核酸上的不同区域而不与捕捉探针杂交。
44. 如权利要求 37 至 42 中任一所述的方法，其中该检测探针含有至少一个 LNA-单体。
45. 一种用于扩增靶核酸的核苷序列的方法，该序列与捕捉探针互补，该方法包括下列步骤
  - a) 提供包含核酸的样品，
  - b) 以含有离液剂的细胞溶解缓冲液处理将该样品，溶解样品中的细胞物质，分解其成分并使样品中的核酸变性，
  - c) 将自样品释出的核酸与至少一种捕捉 LNA-探针接触，该捕捉 LNA-探针以共价方式连接至固体表面，所述该捕捉探针与靶核酸实质上互补，
  - d) 从过量物质中分离出该固体表面，
  - e) 将捕捉的核酸与适量的核苷三磷酸和用于核苷三磷酸聚合的媒介结合，
  - f) 延长任何杂交至捕捉核酸上的寡核苷酸以形成延长的产物，其中捕捉 LNA-探针用作模板，
  - g) 检测所形成的延长产物。
46. 一种用于扩增靶核酸的核苷序列的方法，该序列与捕捉探针互补，该方法包括下列步骤
  - a) 提供含有核酸的样品，

- b) 以含有离液剂的细胞溶解缓冲液处理该样品，溶解样品中的细胞物质，分解其成分和使样品中的核酸变性，
- c) 将自样品释出的核酸与至少一种捕捉 LNA-探针接触，该捕捉 LNA-探针以共价方式连接至固体表面，该捕捉探针与靶核酸实质上互补，
- d) 从过量物质中分离出该固体表面，
- e) 将捕捉的核酸与适量的核苷三磷酸和用于核苷三磷酸聚合的媒介结合，
- f) 延长任何杂交至捕捉核酸上的寡核苷酸以形成延长的产物，其中捕捉 LNA-探针用作模板，
- g) 杂交，在适量的核苷三磷酸和用于核苷三磷酸聚合的媒介存在的条件下，由步骤 c) 而来的单链核酸与至少一个下游的引物合成进一步的延长产物，
- h) 重复步骤 g) 至 b) 足够的次数以能检测出延长产物的量，
- i) 检测所形成的延长产物。

47. 一种用于扩增靶核酸的核苷序列的方法，该序列与捕捉探针互补，该方法包括下列步骤

- a) 提供含有核酸的样品，
- b) 以含有离液剂的细胞溶解缓冲液处理将该样品，溶解样品中的细胞物质，分解其成分和使样品中的核酸变性，
- c) 将自样品释出的核酸与至少一种捕捉 LNA-探针接触，该捕捉 LNA-探针以共价方式连接至固体表面，而该捕捉探针与靶核酸实质上互补，
- d) 从过量物质中分离出该固体表面，
- e) 将捕捉的核酸与适量的核苷三磷酸，用于核苷三磷酸聚合的媒介和至少一个下游引物结合，
- f) 延长任何杂交至捕捉核酸上的寡核苷酸以形成延长的产物，其中所述的捕捉 LNA-探针用作模板，
- g) 检测所形成的延长产物。

48. 一种用于扩增靶核酸的核苷序列的方法，该序列与捕捉探针互补，该方法包括下列步骤

- a) 提供一种含有核酸的样品，
- b) 以含有离液剂的细胞溶解缓冲液处理该样品，溶解样品中的细胞物质，分解其成分和使样品中的核酸变性，
- c) 将自样品释出的核酸与至少一种捕捉 LNA-探针接触，该捕捉 LNA-探针以共价方式连接至固体表面，该捕捉探针与靶核酸实质上互补，
- d) 从过量物质中分离出该固体表面，
- e) 将捕捉的核酸与适量的核苷三磷酸，用于核苷三磷酸聚合的媒介和至少一个

下游引物结合，

- f) 延长任何杂交至捕捉核酸上的寡核苷酸以形成延长的产物，其中捕捉 LNA-探针用作模板，
- g) 杂交，在适量的核苷三磷酸和用于核苷三磷酸聚合的媒介存在下，由步骤 c) 而来的单链核酸与至少一个下游引物合成进一步的延长产物，
- h) 重复步骤 g) 至 h) 足够的次数以检测出延长产物的量，
- i) 检测所形成的延长产物。

49. 用于分离靶核酸的试剂盒，包括

- a) 一种包含用以溶解样品内的细胞物质的离液剂的细胞溶解缓冲液，
- b) 至少一种捕捉 LNA-探针，该捕捉探针与靶核酸实质上互补。

## 说 明 书

## 以单一步骤制备和检测复合生物样品中的核酸

## 发明背景

相关技术的简要说明

传统上将有机溶剂如苯酚和氯仿用于自原核和真核细胞或复合生物样品中分离出核酸的技术。典型的核酸分离先以蛋白酶进行酶促消化，接下来用离子清洁剂溶解细胞，然后用苯酚或一种苯酚/氯仿混合物萃取。于是有机相和水相分离，而核酸分配至水相，可由酒精沉淀回收。然而，苯酚或苯酚/氯仿混合物对人类的皮肤具有腐蚀性，被认为是危险的废弃物，必须谨慎处理、正确地丢弃。而且，萃取法耗时、耗力。Marmur, J. Mol. Biol., 3:208-218 (1961) 描述了从原核生物中提取和纯化组织结构完整的高分子量的DNA的标准制备方法，并使用酶处理，加以清洁剂，并使用有机溶剂如苯酚或苯酚/氯混合物。Chirgwin 等人, Biochemistry, 18:5294-5299 (1979) 描述了从含核糖核酸酶丰富的组织中分离组织结构完整的RNA的方法，用GnSCN和2-巯基乙醇进行均质作用后，使用酒精沉淀或经氯化铯沉降作用。该方法的进展描述于 Ausubel 等人的 Current Protocols in Molecular Biology, pub. John Wiley & Sons (1998)。

另外，离液剂如硫氰酸胍(GnSCN)广泛地用于细胞溶解和将核酸从细胞释出至溶液中，主要的原因是离液序列高的盐类会抑制核酸酶和蛋白酶，同时促使细胞溶解。

核酸杂交是一种已知并纪录下来的用于鉴定核酸的方法。杂交基于核酸链间的碱基互补配对。当单链核酸在适当的缓冲液中孵化时，互补碱基序列会配对成双链稳定的分子。这种配对的存在与否可由本领域的技术人员用不同方法的测出。

与本发明相关的特别值得关注的技术描述于 Dunn & Hassell 于 Cell, Vol. 12, 第 23-36 页 (1977)。他们的分析为三明治-型，其中第一次杂交发生于“靶”核酸与已固定于固体支撑物的“捕捉”核酸探针之间。第二次杂交发生在以萤光团、放射性同位素或抗原决定子典型标记的“信号”核酸探针杂交至固定的“靶”核酸的不同区域。该信号探针的杂交可由如萤光计测得。

Ranki 等人于美国专利第 4,486,539 号及第 4,563,419 号和欧洲专利第 0,079,139 号中描述了三明治-型分析法，其中第一步需要提供单链核酸然后才允许该单链核酸与附在固体载体上的核酸和与以放射性同位素标记的核酸杂交。因此，Ranki 等人的分析方法需要在分析方法中使鉴定的核酸或靶标的核酸先形成单链核酸。

一种在离液序列高的溶液中溶解生物样品和直接在溶解的样品中进行分子杂交的方法描述于 Thompson 及 Gillespie, "Analytical Biochemistry", 163:281-291

(1987)中。也可参见 WO 87/06621。Cox 等人也描述了在用于进行核酸杂交分析和用于自细胞中分离出核酸的方法中使用 GnSCN (EP-A-O-127-327)。

Bresser, Doering 及 Gillespie, 在 "DNA" 2:243-254 (1983) 报道了 NaI 的使用, 和 Manser 及 Gefter, 在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:2470-2474 (1984) 报道了使用 NaSCN 使生物来源的 DNA 或 mRNA 可被硝基纤维膜捕捉或固定, 从而达到适于进行 DNA 或 RNA 探针分子杂交的作用。

使用 LNA 做为捕捉-探针并检测寡体直到现在才开始研究。由于 LNA 的特殊特征, 它能在 DNA 和 RNA 无法形成稳定的杂交物的条件下, 例如, 在纯水或含有清洁剂和高浓度的强离液剂的缓冲液中获得有效的杂交。因此, 可能使捕获-杂交, 检测-杂交和细胞-溶解在一个步骤内完成。本发明对已公开的方法予以本质上简化。

## 发明概述

本发明涉及用于核酸杂交和萃取的组合物及分析方法。特别是, 本发明涉及自复杂的生物样品或样本的细胞中释出核酸, 同时杂交在细胞溶解过程中释出的互补核酸的组合物和方法。LNA 为本发明中关键的成分, 为 DNA 类似物中的一种新的类型, 具有一些特征使其可作为改进体外 DNA 诊断的首选物。该 LNA 单体为双-环化合物, 结构上与 RNA 单体非常相似, 参见通式 I。LNA 与 DNA 和 RNA 的化学性质大部分相同, LNA 为水-溶性的, 可经凝胶电泳分离, 乙醇沉淀等。此外, LNA 寡核苷酸可由标准的磷酸胺 (phosphoramidite) 化学作用方便地合成。磷酸胺化学作用使得含有 LNA 和 DNA(或 RNA) 单体嵌合的寡体合成。因此, 可以制备具有前面所定义的熔化温度 (Tm) 的混合 LNA/DNA 寡体 (oligos)。再者该磷酸胺合成方法进一步促进了带有所有商业上可购得的接头、萤光团和适合于该标准化学反应的标记分子的 LNA 的方便合成。重要地, 将 LNA 单体引入到 DNA 或 RNA 寡体中会造成互补的双链 DNA 或 RNA 前所未有的高热稳定性, 而同时遵守沃森-克里克 (Watson-Crick) 的碱基-配对原则。通常异源双链的热稳定性在双链中每一 LNA-单体增加 3-8°C。已知 LNA 在至今报道的物质中对互补的 DNA 或 RNA 具有最大的亲和力 (Telrahedron, 54, 3607-3630 (1998))。LNA/DNA 和 LNA/RNA 异源双链的热稳定性足够使杂交, 甚至在离液剂如硫氰酸胍 (GnSCN) 的存在下能够有效地进行。

本发明涉及自复杂的生物样品或样本的细胞中释出核酸用以制备用于杂交分析的有效核酸物质的方法。此外也提出了核酸杂交的新方法。特别地, 本发明叙述了自怀疑含有所需的靶核酸的样品中所得核酸的杂交, 其中该样品与一种缓冲液结合, 该缓冲液至少含有一强离液剂, 该离液剂可促使细胞溶解和细胞的核酸的释出而同时可使与 LNA 的杂交进行。于是确定出互补的核酸对靶核酸的杂交的程度。

这些杂交方法的好处是该杂交可在所有试剂都预先结合好后以简单的一步法完成。

## 发明详述

本发明涉及检测自含有核酸的复合生物混合物中所释出的核酸新方法。本发明中的方法可使可能存在于细胞，部分细胞或病毒中的核酸亦即靶核酸轻易地分析出来。该方法包括在含有强离液剂的杂交介质中溶解细胞，在杂交条件下使溶解物与锁定核酸(LNA)接触，该锁定核酸具有与被怀疑存在于细胞中的核苷酸序列实质上互补的核苷酸序列，然后检测出杂交的程度。

该“靶核酸”指脱氧核糖核酸(DNA)，核糖核酸(RNA)(包括核糖体的核糖核酸(rRNA)，转运 RNA(tRNA)，小核(snRNA)，与 RNA 有关的端粒酶，核酶等)的核苷酸序列，这些核苷酸序列倍受关注，且其存在与否可在杂交分析中检测出来。所关注的核酸样品是怀疑含有如特定基因，基因片段或 RNA 的特定靶核酸。特别关注的是源于真核，原核，古老(Archae)或病毒生物的特定的 mRNAs 的检测。重要地，本发明通过分析与已知的特定微生物有关的特定序列，可协助诊断各种传染性疾病。该靶核酸可由含有核酸(RNA，DNA 及/或 rRNA)和非-核酸的复合生物混合物而提供。该靶核酸首选 RNA 分子，特别为 rRNAs 如 16S 或 23S rRNA，其描述于通常所指定的美国专利申请第 08/142,106 号。如果所选择的靶核酸为双链或具有重要的二级和三级结构，在进行杂交之前需要加热。在这种情况下，可在将核酸引入含有捕捉探针的杂交介质之前或之后进行加热。在某些情况下还希望在进行杂交分析之前自复合的生物性样品中萃取核酸，以便通过本领域技术人员所公知的任何方法减少背景值的影响。

本发明中的杂交和萃取方法适用于包含核酸(RNA 和/或 DNA)和非-核酸的复杂生物混合物。所述的复杂的生物混合物包括广范围的真核和原核细胞，包括原生质体，或其它具有靶核酸的生物物质。因此，该方法适用于组织培养动物细胞，动物细胞(例如，血液，血清，血浆，网状细胞，淋巴细胞，尿液，骨髓组织，脑脊髓液或任何由血液或淋巴制备的产物)或任何形式的组织活组织检查(例如，肌肉组织活组织检查，肝脏活组织检查，肾脏活组织检查，膀胱活组织检查，骨髓活组织检查，软骨活组织检查，皮肤活组织检查，胰脏活组织检查，肠活组织检查，胸腺活组织检查，乳房活组织检查，子宫活组织检查，睾丸活组织检查，眼睛活组织检查，或脑活组织检查，使其均质于溶解缓冲液中)，植物细胞或其它对渗透压改变敏感的细胞和细菌细胞，酵母菌，病毒，支原体，原生动物，立克次氏体，真菌和其它小微生物细胞等。本发明的分析及分离方法可用于，例如，检测所关注的非-病原性或病原性微生物。由检测已知来源的核苷酸探针与存在于生物样品中的核酸之间特异杂交可确定存在的微生物。

含有高浓度的胍，鸟嘌呤硫氰酸盐或某些其它的离液剂和清洁剂的溶液能有

有效地溶解原核和真核细胞而同时允许 LNA 探针与释出的内源核酸进行特异性杂交。该溶液除含一般缓冲液和清洁剂以促进细胞溶解及核酸杂交外不需要含有其它成分。

如果在杂交之前进行萃取，有机溶剂如苯酚和氯仿可用于分离核酸的技术中。传统上，利用相分离，用有机溶剂如苯酚或苯酚-氯仿的混合物萃取核酸，(Ausubel 等人 *Current Protocols in Molecular Biology*, pub. John Wiley & Sons (1998))。这些方法可与本发明的细胞溶解溶液有效地一起使用；然而本发明方法的优点在于不需要繁琐的萃取方法，因此改进了高生产能力的分析方法。优选的是，该溶解缓冲液/杂交介质含有标准的缓冲液和清洁剂以促进细胞溶解而同时允许 LNA 探针有效地杂交。缓冲液如柠檬酸钠，Tris-HCl，PIPER 或 HEPES，优选 Tris-HCl 使用浓度约为 0.05 至 0.1 摩尔浓度。该杂交介质优选还含有约 0.05 至 0.5% 的离子或非离子清洁剂，如十二烷基硫酸钠(SDS)或 Sarkosyl (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) 和 1 至 10 毫摩尔浓度的 EDTA。也可以包括其它添加剂，如包括各种极性水-溶或膨胀剂的体积排阻剂，如阴离子聚丙烯酸酯或聚甲基丙烯酸酯，和带电的糖类聚合物，如硫酸葡聚糖及其类似物。可以控制杂交的特异性和严格性，例如，改变离液剂的浓度及型态和 NaCl 的浓度，一般在 0 至 1 摩尔浓度间改变 NaCl 的浓度，如 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 或 1.0。

离液剂可破坏蛋白质的二级和三级结构，例如，胍盐如盐酸胍(GnHCl)和硫氰酸胍(GnSCN)，或尿素，氯化锂和其它硫氰酸盐可与清洁剂及还原剂如  $\beta$ -巯基乙醇或 DTT 联合使用以分开自然产生的核酸和抑制核酸酶。核酸的萃取和杂交中离液剂的使用描述于欧洲公开号 0 127 327 中，其被本文引用作为参考。

在杂交反应过程中引入实质上与靶核酸互补的 LNA。术语“实质上与靶核酸互补的 LNA”指含有至少一个 LNA 单体和各种自然产生的核苷酸或其类似物的多核苷酸或寡核苷酸，如 7-脱氮鸟苷或肌苷，这些核苷酸在杂交条件下可充分的与靶核酸互补而进行杂交，因而靶核酸和互补核酸可稳定且专一地结合。因此，LNA 序列不需要反映出靶核酸的确切序列。例如，非-互补性的核苷酸片段可以连接到互补的核苷酸片段上，或者，非-互补性碱基或较长的序列可散在互补的核酸中，条件是互补的核酸序列具有足够的与靶核酸序列杂交的互补性，形成杂交复合物且可进一步将靶核酸固定到固体支持物上，进一步的详细说明见后。与由细胞释出的核酸相结合的捕捉探针可与一基团相连(例如生物素，萤光素，磁性微粒子等)。此外，该捕捉探针可预先经由如蕙醌光化学(WO 96/31557)永久性地结合至固相或粒子上。

本发明中可能引人注意的是抗基因组中的不同序列使用了不同的 LNA-寡聚物，这些不同的序列点状分布成数组，并永久性地固定于其表面(Nature Genetics, suppl. Vol. 21, Jan 1999, 1-60 和 WO96/31557)。接着此数组可用含有溶解细胞的细胞溶解缓冲液/杂交介质和一些适合的检测 LNA-探针的混合物孵化。接着可发生溶

解和杂交，最后再清洗该数组及适当地发展该数组。这些方法的结果将对大量不同的靶核酸作半-定量评估。

对于 DNA 或 RNA，需要形成稳定的包含 LNA 的杂交复合物(双链)的互补程度根据杂交介质和/或清洗介质的严格性的不同而变化。该互补核酸可存在于预先制备的杂交介质中或于杂交之前引入。

杂交介质与生物样品结合以促使细胞溶解和核酸配对。优选地，该生物样品的体积与杂交介质的体积比约为 1:10。

本发明中杂交的方法的倾向和优点是可在复杂的生物样品中以单步进行。然而，在某些情况下要考虑到少数技巧上或其它处理方面的问题。例如，可能希望在杂交之前利用如低速离心或过滤将细胞溶解物净化或者在杂交之前用如上述方法萃取核酸。

本发明的杂交分析法可以任何本领域公知的方法或在给定指导方针情况下的类似于免疫分析方法的方法进行。优选的分析方法为三明治分析法及其变异法和竞争或取代分析法。杂交技术一般描述于“核酸杂交,一种实用方法” (Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach), Ed. Harnes, B. D. 和 Higgins, S. J. IRL Press, 1985; Gall 和 Pardue (1959), Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 63:378-383; 和 Jonh, Byrnsteil 及 Jones (1969) Nature, 223:582-587。杂交技术的进一步改进被本领域的人员所熟知且可容易的应用于实验中。

本发明中的捕捉 LNA-探针典型地附于一固体表面例如微滴定盘的井孔或微珠状物的表面。因此可进行一种方便而非常有效的清洗方法，而使各种酶动力为基础的反应的可能性表现出来，该酶动力为基础的反应可促进本发明的进行。最值得注意的是本杂交分析法的敏感度可通过使用增加所测靶核酸的核酸扩增系统得到增加。此系统的实例包括聚合酶链反应(PCR)系统和连接酶链反应(LCR)系统。近来描述的并且为本领域所熟知的其它方法是以核酸序列为为基础的扩增反应(NASBA<sup>TM</sup>, Cangene, Mississauga, Ontario)和 Q  $\beta$  复制酶系统。PCR 是一种模板依赖 DNA 聚合酶引物延长来复制所选择的 DNA 序列的方法。本方法依靠使用过量的特定引物来启动 DNA 多核苷酸的特定下游序列的 DNA 聚合酶复制反应，接着进行重复的变性作用和聚合酶延长步骤。PCR 系统为本领域技术人员所公知(参见 US4,683,195 和 US4,683,202 号)。其它关于 PCR 方法的信息，也可参见 PCR Protocols: A Guide to Methods and Application, ed. Innis, Gelland, Shinsky 和 White, Academic Press, Inc. (1990)。进行 PCR 所需的反应试剂和硬件设备可由 Perkin-Elmer/Cetus Instrument of Norwalk, Conn 商购得到。

LCR 与 PCR 相似，利用数个改变温度的循环来扩增 DNA 靶序列，然而，LCR 并不用个别的核苷酸进行模板延长。相反地，LCR 依靠过量的互补于 DNA 双链的靶区域的寡核苷酸延长模板。使双链 DNA 模板变性后，在 LCR 程序中连接两个寡核苷酸引物互补于靶序列的其中一股链的邻接区域。与双链中任何一股链互补

的寡核苷酸即可被连结起来。连接反应和进行第二次变性反应之后，原先的双链模板和两个新形成的产物链可作为下一次连接反应的模板以对靶序列提供一指数式扩增。此方法已详述于 *Genomics*, 4:560-569(1989) 其参见资料结合后文。至于其它已发展的扩增系统也可使用于本发明中。

本发明的杂交的介质和杂交方法唯一地适合于单步分析法。该介质可预先制备，不论是商业上购得或是实验室自己配制只要含有杂交所有必须的成分即可。例如，三明治分析法中该介质包含离液剂(例如硫氰酸胍)，所需要的缓冲液和清洁剂，结合于固体表面，如微珠状物的捕捉 LNA-探针，和一种可以是 LNA 的检测核酸。此介质只需在进行分析时与含有靶核酸的样品结合。杂交一旦发生，附着到固体支持物上的当杂交复合物可以被清洗并可以测出此杂交的程度。

三明治分析法系商业上所用的用以检测或分离核酸序列的杂交分析法。此分析法利用共价固定于一固体支持物上的“捕捉”核酸和溶液中标记的“信号”核酸。样品会提供靶核酸。该“捕捉”核酸和“信号”核酸探针与靶核酸杂交形成“夹心”杂交复合物。为了提高效率，该信号核酸设计成不与捕捉核酸杂交，但与不同的位置和靶核酸杂交而不与捕捉探针杂交。

实际上，任何固体表面都可作为杂交分析法的支持物，包括金属和塑料。两种一般可获得的固体表面为：

- a) 膜，聚苯乙烯珠状物，尼龙，特氟龙 (Teflon)，聚苯乙烯/乳胶珠状物，乳胶珠状物或任何具有活性的羧酸盐，磷酸盐，磷酸盐或类似的活性基团的固体支持物皆适合作为固体表面底物使核酸或寡核苷酸能够固定在上面。
- b) 多孔洞的膜，其具有可商购得到的预-活化表面(例如， Pall Immunodyne Immunoaffinity Membrane, Pall BioSupport Division, East Hills, N. Y., 或 Immobilon Affinity membranes from Millipore, Bedford, Mass.)且其可用来固定捕捉寡核苷酸。还可以使用微珠状物，包括聚苯乙烯，特氟龙，尼龙，二氧化硅或乳胶的磁性珠状物。

然而，所用的 a) 和 b) 提及的一般可获得的表面中经常会产生背景值问题，尤其当使用杂交的方法分析核酸和其它各种溶解的生物-分子混在一起形成的复杂混合物时。当捕捉-探针由基于本领域所描述(参见 WO96/31557)的光连接方法的蒽醌 (AQ) 共价连接到固体表面时，背景值将会大大降低。本方法允许捕捉 LNA-寡体共价连接到大多数聚合材料的固体表面 (包括各种热稳定较好的聚合物如聚碳酸盐和聚乙烯) 以及处理过的玻璃表面。因此通过使用 AQ 光连接方法，该捕捉 LNA-探针可连接到容器表面，其与现今的 PCR 扩增技术一致。

用于杂交分析法中适合做捕捉或信号核酸的序列可由有机体的基因组中的整段序列或部分序列而获得，由信使 RNA，或由 cDNA 通过反转录信使 RNA 得到。由所获得的序列得到核苷酸序列的方法为本领域所公知(参见 Ausubel 等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, pub. John Wiley & Sons(1998) 和 Sambrook 等

人, Molecular Cloning, 实验室操作手册, 冷泉港实验室出版, 1989)。再者, 可使用一些公开的和商业上的序列数据库来获得有意义的序列。

一旦确定适当的序列后, 优先选用商业上可获得, 如本领域所描述的方法和设备化学合成 LNA 探针 (Terahedron, 1998, 554, 3607-30)。例如, 固相磷酸胺方法可用来制造短的 LNA 探针。(Caruthers 等, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 47:411-418(1982), 和 Adams 等人 Am. Cchem.Soc., 105:661(1983)。

当为特定的靶合成探针时, 核苷酸序列的选择将确定此次测试的特异性。例如由对比数种病毒分离株的 DNA 序列, 可选择检测病毒的序列, 或为类型专一或物种专一。可用商业上可获得的计算机程序来达到对比 DNA 区域和序列的目的。

确定杂交的程度可由本领域中的任何公知的方法来进行。如果没有可检测到的杂交, 则此杂交的程度为 0。通常, 以标记信号核酸来检测杂交。互补核酸或信号核酸可用数种用于检测杂交多核苷酸存在的方法中的任一种加以标记。最常见的检测方法利用了与标记的抗体结合的配体, 萤光团或化学荧光剂。然而, 也可用  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{33}\text{P}$  或  $^{32}\text{P}$  来标记探针并随后用放射自显影术检测。而放射性同位素的选择取决于研究首选, 这是由于合成反应的容易度, 稳定性的改变, 和所选同位素的半衰期的影响。其它标记包括抗体, 其对于标记的配体可作为特异性结合配对成员。标记物的选择则依照实验所需的敏感度, 与探针接合的容易度, 所需的稳定度, 和可提供的仪器来决定。

一般 LNA-探针是在合成过程中加以标记。磷酸胺合成的灵活性更加有助于容易地产生携带所有商业上可获得的接头的 LNAs、适用于本标准化学作用的萤光团和标记分子。LNA 也可由酶反加如由激酶反应加以标记。

可以想象当检测探针为 DNA 或 RNA 时的情况。这种探针可依照标记的选择而以各种方式加以标记。一般是用商业上可购得含有所需的放射性同位素的核苷酸来制造放射性探针。该放射性核苷酸可由数种方式结合至探针中如双-链探针的缺口平移反应; 在放射性 dNTP 存在时复制单-链 M13 质粒, 该 M13 质粒具有带有 DNA 聚合酶的 Klenow 片段的特定插入片段; 在放射性 dNTP 存在时用反转录酶从 RNA 为模板转录 cDNA; 在放射性 rNTP 存在时从含有 SP6 启动子或 T7 启动子的载体利用 SP6 或 T7 RNA 聚合酶转录 RNA; 利用末端转移酶为探针的 3' 末端加上放射性核苷酸; 或利用  $[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  和多核苷酸激酶磷酸化探针的 5' 末端。

非-放射性探针经常由间接的方式加以标记。通常, 配体分子共价结合至探针上。然后该配体结合至一抗-配体分子, 该抗-配体分子可固有地可被检测地或共价结合至一信号系统, 如可检测的酶, 萤光化合物, 或化学发光化合物。配体和抗-配体可广泛地改变。当一配体具有自然的抗-配体, 例如生物素, 甲状腺素, 和皮质醇时, 其可与标记的、自然产生抗-配体结合。另一方面, 任何半抗原或抗原化合物可用于与抗体结合。

至于 DNA, LNA-探针也可直接连结至信号产生化合物, 例如, 连接至酶或萤

光团。值得关注的作为标记的酶主要是水解酶，特别为磷酸酶，酯酶和糖苷酶或氧化还原酶，特别为过氧化物酶。萤光化合物包括萤光素及其衍生物，罗丹明及其衍生物，丹磺酰，缴形酮等。化学发光化合物包括虫萤光素，AMPPD([3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3'-磷酰氧基)-苯基-1,2-二氧杂环丁烷])和 2,3-二水合酞噪二酮，例如 3-氨基邻苯二甲酰环阱。

杂交介质或萃取溶液中存在的标记探针的数量范围可非常广泛。一般来说，大量过量的超过靶核酸的化学计量量的探针将用来加强探针与靶 DNA 的结合率。将反应容器浸入商业上购得的声波池中以超音波处理经常可加速杂交的速率。

在适合于特定杂交所用的溶液的温度杂交和一段时间后，将捕捉 LNA-探针：靶核酸杂交复合物所粘附的支持物在杂交之后引入于清洗溶液中，通常该清洗溶液含有与杂交溶液所提供的试剂相类似的试剂 (例如，氯化钠，缓冲液，有机溶剂和清洁剂)。这些试剂的浓度可以与杂交介质的浓度相似，但是当需要较严格的清洗条件时，其经常是低于杂交介质的浓度。该支持物保持于清洗溶液中的时间可由数分钟至数小时或更久。

不论是杂交或是清洗介质其条件都很严格。经过适当严格的清洗后，按照标记的特性就可检测出正确的杂交复合物。

探针可直接与该标记连接。例如，当标记为放射性时，与杂交复合物的底物结合的探针就暴露于 X-射线底片。而该标记为萤光的时，通过首先用特定波长的光照射该样品而检测样品。该样品吸收此光并然后发出不同波长的光而被检测器所接收 (Physical Biochemistry, Freifelder, D., W. H. Freeman & Co. (1982), pp.537-542)。当该标记为酶时，该样品通过在用于该酶的适当的底物上孵化进行检测。所产生的信号可以是有色沉淀，有色的或萤光的可溶性物质，或以生物发光或化学发光所产生的光子。用于探针分析的优选标记产生有色沉淀以指示正读数，例如辣根过氧化物酶，碱性磷酸酶，小牛肠内碱性磷酸酶，葡萄糖氧化酶和  $\beta$ -半乳糖苷酶。例如，碱性磷酸酶将去磷酸化吲哚磷酸酯，其然后在还原反应中沉淀将四唑鎓转化为高度着色和不溶性的偕苯偶氮盐 (formazans)。

检测杂交复合物需要产生复合物的信号与双链的靶和探针多核苷酸或核酸结合。典型地，这种结合通过配体和抗-配体的相互作用如配体-接合探针和与信号接合的抗-配体之间的相互作用发生。与信号产生复合物的结合也可通过暴露于超音波容易地加速。

标记也可以间接检测杂交复合物。例如，标记为半抗原或抗原时，样品可利用抗体检测。在这些系统中，信号是通过将萤光或酶分子吸附至抗体或其它个例中，通过与放射性标记接附产生的。 (Tijssen, P., "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays," Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Burdon, R. H., van Knippenberg, P. H., Eds., Elsevier(1985), pp.9-20 )

本文中，术语“标记”指通过其本身或检测系列中的一部份而可被检测的基团。

报告基因的官能部分的实例有生物素, 地高辛配基, 荧光基团(可吸收电磁射线, 例如特定波长的光或 X-射线, 和接着将所吸收的能量转变成波长较长的辐射的基团; 说明性实例为丹酰 (5-二甲氨基)-1-萘磺酰基), DOXYL (N-氨基-4,4-二甲基𫫇唑烷), PROXYL (N-氨基-2,2,5,5-四甲基吡咯烷), TEMPO (N-氨基-2,2,6,6,-四甲基哌啶), 二硝基苯基, 叶啶, 香豆素, Cy3 和 Cy5 (生物检测系统公司的商标), 原藻红, 香豆酸, 缩形酮, 德克萨斯红, 若丹明, 四甲基若丹明, Rox, 7-硝基苯并-2-氧杂-1-二唑(NBD), 茜, 萤光黄, 钡, 钫, 钆, 和其它稀土金属), 放射性同位素标记, 化学发光标记(在化学反应过程中通过发出光可检测到的标记), 自旋标记(自由基(例如取代的有机硝基氧)或其它利用电子自旋共振光谱学可检测的结合至生物分子的顺磁性的探针(例如  $Cu^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ )), 酶(例如过氧化物酶, 碱性磷酸酶,  $\beta$ -半乳糖苷酶, 和葡萄糖氧化酶), 抗原, 抗体, 半抗原(可与抗体结合的, 但本身不能激活免疫反应基团, 如肽和类固醇激素, ), 细胞膜穿透载体系统如: 脂肪酸残基, 类固醇部分(胆固醇基), 维生素 A, 维生素 D, 维生素 E, 作为特异性受体的叶酸肽, 介导细胞内吞作用的基团, 表皮生长因子(EGF), 缓激肽, 血小板衍生生长因子(PDGF)。特别关注的实例为生物素, 萤光黄, 德克萨斯红, 若丹明, 二硝基苯基, 地高辛配基, 钡, 钫, Cy5 , Cy3 等。

关于 RNA 的分离, 已详述于 US5,376,529, 其中离液剂, 如异硫氰酸盐类(例如硫氰酸胍)不能对蛋白质和核酸相互间提供完整的破坏, 因而阻碍了理想的杂交。已有报告指出当加热含有离液剂和靶核酸的杂交溶液时杂交作用会显著增加。以前, 研究人员想以低温度的杂交来维持反应物的稳定。参见 Cox 等人, 欧洲专利申请第 84302865.5。然而, 随着 LNA/DNA 和 LNA/RNA 异源双链分子的热稳定性的显著增加使得与 LNA-探针的杂交在高温度更为容易。因此, 本发明提供一种方法增加核糖核酸检测分析的敏感性并简化分析步骤。按照现有技术, 用于进行核酸杂交的方法包括加热核酸溶液或样品至高温度, 如 70-100°C, 其中靶核酸为 RNA(美国专利第 5,376,529 号)。本发明的核酸溶液包含离液剂, 靶核酸, 和与所关注的靶核酸本质上互补的 LNA。将核酸溶液加热至蛋白质和核酸相互间的作用充分被破坏, 以使 LNA 与其靶核酸间的杂交达到最大。

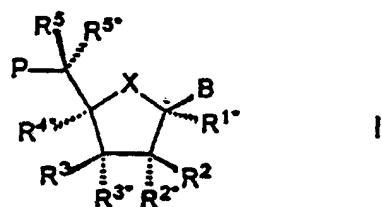
当使用高亲和力的 LNA 探针时，杂交甚至可在足以完全破坏 DNA:DNA 和 DNA:RNA 间的相互作用的高温发生。之后将该溶液冷却，直至互补性核酸已经与靶核酸杂交形成杂交复合物。

这些方法有其它的优点，因为其允许样品和分析试剂操作最小化。可提供现成可用的试剂溶液，例如，该溶液含有离液剂，其它适合的成分如缓冲液或清洁剂，连接至固体支持物的捕捉 LNA-探针，和可与靶核酸杂交的信号或检测 LNA(或核酸)。方便地，怀疑含有靶核酸的复杂生物样品可直接与预先制备的用于杂交的试剂结合，因此让该杂交作用发生于一个步骤中。如本文中所述，将该结合的溶液加热和冷却至杂交已经发生。然后简单地清洗形成的杂交复合物，以去除未杂

交的物质，并确定杂交的程度。

用于核酸的萃取和杂交的试剂盒，例如 mRNA，也是在计划之内的。此试剂盒含有至少一个小瓶，其包含萃取溶液或杂交介质，该杂交介质含有一种强离液剂和与固体支持物结合的捕捉 LNA-探针。也可包含清洁剂，缓冲溶液和包含检测靶核酸成分的其它小瓶。

本文中使用的术语“LNA”或“捕捉 LNA-探针”是指包含至少一种通式 I 的核苷类似物的寡聚物及其碱性盐和酸性加成盐：



其中 X 选自-O-，-S-，-N(R<sup>N\*</sup>)-，-CR<sup>6</sup>(R<sup>6\*</sup>)-；

B 选自核碱基；

P 指连接到下一单体的核苷间键合的基团位置，或 5'端基的位置，此核苷间键合或 5'端基任选地包括取代基 R<sup>5</sup>；

R<sup>3</sup>或 R<sup>3\*</sup>为 P\*，其指与前一个单体或 3'端基相连的核苷间键合；

R<sup>4\*</sup>和 R<sup>2\*</sup>共同指由 1-4 个基团/原子组成的双游离基，所述 1-4 个基团/原子选自-C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-，-C(R<sup>a</sup>)=C(R<sup>b</sup>)-，-C(R<sup>a</sup>)=N-，-O-，-Si(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>-，-S-，-SO<sub>2</sub>-，-N(R<sup>a</sup>)-，和 >C=Z，

其中 Z 选自-O-，-S-，和-N(R<sup>a</sup>)-，并且 R<sup>a</sup>与 R<sup>b</sup>各自独立的选自氢，任选取代的 C<sub>1-12</sub>-烷基，任选取代的 C<sub>2-12</sub>-链烯基，任选取代的 C<sub>2-12</sub>-炔基，羟基，C<sub>1-12</sub>-烷氧基，C<sub>2-12</sub>-烯氧基，羧基，C<sub>1-12</sub>-烷氧基羰基，C<sub>1-12</sub>-烷基羰基，甲酰基，芳基，芳氧基羰基，芳氧基，芳基羰基，杂芳基，杂芳氧基-羰基，杂芳氧基，杂芳基羰基，氨基，一-和二(C<sub>1-6</sub>-烷基)氨基，氨基甲酰基，一-和二(C<sub>1-6</sub>-烷基)-氨基-羰基，氨基-C<sub>1-6</sub>-烷基-氨基羰基，一-和二(C<sub>1-6</sub>-烷基)氨基-C<sub>1-6</sub>-烷基-氨基羰基，C<sub>1-6</sub>-烷基-羰基氨基，脲基，C<sub>1-6</sub>-烷酰氧基，磺酰基 (sulphono)，C<sub>1-6</sub>-烷基磺酰氧基，硝基，叠氮基，亚磺酰基 (sulphonyl)，C<sub>1-6</sub>-烷基-硫，卤素，DNA 嵌入剂，光化学活性基团，热化学活性基团，螯合基，报道基因，和配体，其中芳基和杂芳基可任选地被取代，并且其中两个双取代基 R<sup>a</sup>及 R<sup>b</sup>共同指任选取代的亚甲基(=CH<sub>2</sub>，被如对芳基的任选取代基所定义的取代基任选地取代一或二次)；和

存在的但不包含于 P 或 P\*中的取代基 R<sup>1\*</sup>，R<sup>2</sup>，R<sup>3</sup>，R<sup>3\*</sup>，R<sup>5</sup>，R<sup>5\*</sup>，R<sup>6</sup>和 R<sup>6\*</sup>，各自独立地选自氢，任选取代的 C<sub>1-12</sub>-烷基，任选取代的 C<sub>2-12</sub>-链烯基，任选取代的 C<sub>2-12</sub>-链炔基，羟基，C<sub>1-12</sub>-烷氧基，C<sub>2-12</sub>-烯氧基，羧基，C<sub>1-12</sub>-烷氧基羰基，C<sub>1-12</sub>-烷基羰基，甲酰基，芳基，芳氧基-羰基，芳氧基，芳羰基，杂芳基，杂芳氧基-羰基，杂芳氧基，杂芳基羰基，氨基，一-和二(C<sub>1-6</sub>-烷基)氨基，氨基甲酰基，一-

和二( $C_{1-6}$ -烷基)-氨基-羧基, 氨基- $C_{1-6}$ -烷基-氨基羧基, 一-和二( $C_{1-6}$ -烷基)氨基- $C_{1-6}$ -烷基-氨基羧基,  $C_{1-6}$ -烷基-羧基氨基, 脲基,  $C_{1-6}$ -烷酰基氨基, 磺酰基,  $C_{1-6}$ -烷基磺酰氨基, 硝基, 叠氮基, 亚磺酰基,  $C_{1-6}$ -烷硫基, 卤素, DNA 嵌入剂, 光化学活性基团, 热化学活性基团, 融合基, 报道基因, 和配体(其中后面的基团可以包括如对取代基 B 所定义的间隔物), 其中芳基和杂芳基可任选地被取代, 其中两个双取代基可共同指氧代, 硫代, 亚氨基, 或任选取代的亚甲基, 或者可共同形成由 1-5 个碳原子亚烷基链组成的螺旋双游离基, 该亚烷基链可选择性地被一个或多个选自-O-, -S-, 和-(NR<sup>N</sup>)-的杂原子/基团中断和/或结束, 其中 R<sup>N</sup> 系选自氢和  $C_{1-4}$ -烷基, 并且其中两相邻(非-双)取代基可指定生成双键的另外的键; 和 R<sup>N\*</sup>, 当其存在且与双游离基无关时, 选自氢及  $C_{1-4}$ -烷基。

本文中使用的术语“LNA”(锁定的核苷类似物 Locked Nucleoside Analogues)指并入寡聚物的双-环核苷类似物(通式 I)。

本文中，术语“核碱基”包含自然产生的核碱基和非-自然产生的核碱基。如本领域的技术人员所知，一些以前认为的“非-自然产生”的核碱基后来在自然界中已发现。因此，“核碱基”不只包括已知的嘌呤和嘧啶杂环，也包括杂环类似物和其互变异构物。核碱基的说明性实例是腺嘌呤，鸟嘌呤，胸腺嘧啶，胞嘧啶，尿嘧啶，嘌呤，黄嘌呤，二氨基嘌呤，8-氧化-N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤，7-去氮杂黄嘌呤，7-去氮杂鸟嘌呤，N<sup>4</sup>,N<sup>4</sup>-桥亚乙基胞嘧啶，N<sup>8</sup>,N<sup>6</sup>-桥亚乙基-2,6-二氨基嘌呤，5-甲基胞嘧啶，5-(C<sup>3</sup>-C<sup>5</sup>)-炔基胞嘧啶，5-氟尿嘧啶，5-溴尿嘧啶，假异胞嘧啶，2-羟基-5-甲基-4-三偶氮吡啶 (triazolopyridine)，异胞嘧啶，异鸟嘌呤，肌苷和详述于 Benner 等人的美国专利第 5,432,272 号中的“非-自然产生”的核碱基。术语“核碱基”涵盖每一种和所有的这些实例及其类似物和互变异构体。尤其关注的核碱基是腺嘌呤，鸟嘌呤，胸腺嘧啶，胞嘧啶，和尿嘧啶，这些都认为是与人类的治疗和诊应用有关的自然产生的核碱基。

本文中所使用的术语“DNA 嵌入剂”指可插入至 DNA 或 RNA 融合，双链体或三链体的基团。DNA 嵌入剂的官能部分的实例为吖啶，蒽，醌如蒽醌，吲哚，喹啉，异喹啉，二羟基醌，蒽环素，四环素，亚甲基蓝，蒽环酮，补骨脂素，香豆素，卤化 3,8-二氨基-5-乙基-6-苯基菲啶鎓，dynemicin，金属复合物如 1,10-菲咯啉-铜，三(4,7-联苯基-1,10 菲咯啉)钌-钴-烯二炔如卡开素(calicheamicin)，卟啉，远端霉素，纺锤菌素，紫罗酮(viologen)，柔红霉素。尤其值得关注的实例为吖啶，醌如蒽醌，亚甲基蓝，补骨脂素，香豆素，和卤化 3,8-二氨基-5-乙基-6-苯基菲啶鎓。

本文中，术语“光化学活性基团”涵盖可经受由光辐照引发的化学反应的化合物。关于此官能团的说明性实例为醌，尤其是 6-甲基-1,4-萘醌，蒽醌，萘醌，和 1,4-二甲基-蒽醌，二氮杂苯 (diazirines)，芳香族氮化物，二苯甲酮，补骨脂素，重氮化合物，和二氮杂苯 (diazirino) 化合物。

本文中，“热化学活性基团”定义为一官能团，该官能基团可与其它基团由热化学诱发而形成共价键。热化学活性基团的官能部分的说明性实例为羧酸、羧酸酯如活性酯、羧酸卤化物如酰基氟，酰基氯，酰基溴，和酰基碘、羧酸氮化物、羧酸酰肼、磺酸、磺酸酯、磺酸卤化物、氨基脲、硫氨基脲、乙醛、酮、伯醇、仲醇、叔醇、苯酚、烷基卤、硫醇、二硫化物、伯胺、促胺、叔胺、肼、环氧化物、马来酰亚胺和硼酸衍生物。

本文中，术语“螯合基”指含有一个以上的结合位置且经常同时以一个以上的结合位置与其它分子，原子或离子结合的分子。螯合基的官能部分的实例为亚氨基二乙酸，氨三乙酸，乙二胺四乙酸(EDTA)，氨基膦酸等。

本文中，“配体”意指可与某些物质成键的化合物。配体可包括官能团如：芳基(如苯，吡啶，萘，蒽，和菲)、杂芳基(如噻吩，呋喃，四氢化呋喃，吡啶，二噁烷和嘧啶)、羧酸、羧酸酯、羧酸卤化物、羧酸氮化物，羧酸酰肼、磺酸、磺酸酯、磺酸卤化物、氨基脲、硫氨基脲、乙醛、酮、伯醇、仲醇、叔醇、苯酚、烷基卤、硫醇、二硫化物、伯胺、促胺、叔胺、肼、环氧化物、马来酰亚胺、C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>烷基，其可选择地以一个或多个杂原子如氧原子，氮原子和/或硫原子中断和/或终止，选择性可含有芳香族或单/多不饱和烃，聚环氧乙烷如聚乙二醇，寡/聚酰胺如聚-β-丙氨酸，聚甘氨酸，聚赖氨酸，肽，寡/多糖类，寡/聚磷酸酯，毒素，抗生素，细胞毒物，和类固醇及“亲和力配体”，即对特定蛋白质，抗体，多糖和寡糖，和其它生物分子的位置具有特异性亲和力的官能团或生物分子。

本领域的技术人员很清楚，以上所提及的特定的有关DNA嵌入剂，光化学活性基团，热化学活性基团，螯合基，报道基因，和配体的实例与讨论中的基团的“活性/官能”部分相对应。对于本领域的技术人员更加清楚的是DNA嵌入剂，光化学活性基团，热化学活性基团，螯合基，报道基因，和配体典型地以M-K-形式表示，其中M为讨论中的基团的“活性/官能”部分，而K为间隔物，通过该间隔物“活性/官能”部分连接到5-或6-元环上。因此，应当理解当B选自DNA嵌入物，光化学活性基团，热化学活性基团，螯合基，报道基因和配体时，基团B具有M-K-形式，其中M为DNA嵌入物，光化学活性基团，热化学活性基团，螯合基，报道基因和配体的各基团的“活性/官能”部分，K为可选择的包含1-50个原子，优选1-30个原子，特别为1-15个原子，在5-或6-元环与“活性/官能”部分之间的间隔物。

本文中，术语“间隔物”指热化学作用和光化学作用的非-活性距离生成基团，该基团用来连接两个或多个上述定义的类型的不同部分。基于不同分子的特性包括疏水性，亲水性，分子柔顺性和长度(例如参见Hermanson等人“固定的亲和力配体技术(Immobilized Affinity Ligand Techniques)，Academic Press，圣地亚哥，加州(1992)，p.137-ff)来选择间隔物。一般来说，间隔物的长度小于或等于约400Å，在一些应用上优选小于100Å。因此，该间隔物包括任选用一个或多个杂原子，如氧原子，氮原子和/或硫原子中断或结束的碳原子链。因此，该间隔物K可以包括一

个或多个酰氨，酯，氨基，醚和/或硫醚官能团，和任选的芳香族或单/聚不饱和烃，聚氧乙烯如聚乙二醇，寡/聚酰胺如聚- $\beta$ -丙氨酸，聚甘氨酸，聚赖氨酸和肽，通常还有寡糖，寡/聚磷酸酯。此外，该间隔物可由其结合成的单位所组成。考虑到理想的或必须的基团的活性/官能”部分的定位和空间取向与 5-或 6-元环的关系，该间隔物的长度可以变化。特别值得关注的实施方案，该间隔物包括一化学上可劈开的基团。此化学上可劈开的基团的实例包括在还原条件下可劈开的二硫化物基团，由肽酶可劈开的肽的片段等。

变量 K 指一个单键以使所讨论的基团的”活性/官能”部分直接连接到 5-或 6-元环上。

在一个优选实施方案中，通式 I 中的取代基 B 优选选自核碱基，特别选自腺嘌呤，鸟嘌呤，胸腺嘧啶，胞嘧啶和尿嘧啶。

在寡聚物中(式 I), P 指用于核苷间键合的连接至下一单体的基团位置, 或 5'-端基的位置。第一个可能性适用于当所讨论的 LNA 不是 5'-末端“单体”时, 而后一可能性适用于当所讨论的 LNA 是 5'-末端“单体”。应理解(也可由进一步说明如下的核苷间键合和 5'-端基的定义了解)此核苷间键合或 5'-端基可包括取代基 R<sup>5</sup>(或同样适用的取代基 R<sup>5\*</sup>)从而与 P 基团形成一双键。(5'末端指核苷内对应于核糖部分的 5'碳原子的位置)。

另一方面，与前一个单体或 3'-端基( $P'$ )相连的核苷间键合可源自以取代基  $R^3$  或  $R^{3*}$  之一所定义的位置，优选为来自以取代基  $R^{3*}$  所定义的位置。(3'-末端指核苷内对应于核糖部分的 3' 碳原子的位置)

应理解到作为  $R^3$  (“正常”的结构)或  $R^3$  (木 (xylo) 结构)的  $P^*$  基团的取向代表着两种同样有趣的可能。已发现所有 “正常”( $R^3=P^*$ )寡聚物和具有 “正常”LNA 单体和核苷酸(2-脱氧核苷酸和/或核苷酸)结合的寡聚物强烈地与 DNA, RNA 和其它 LNA 寡聚物杂交(亲和力会增加)。目前认为结合所有-木 LNA 寡聚物和具有木 LNA( $R^3=P^*$ )单体的寡聚物和, 例如, 木核苷酸(核苷酸和/或 2-脱氧核苷酸)将引起类似的杂交特性。已显示出当具有“正常”结构( $R^3=P^*$ )的寡聚物杂交(亲和力会增加)至 DNA, RNA 和其它 LNA 寡聚物时可引起一反向平行取向的 LNA 寡聚物。因此要设想当一具有木结构( $R^3=P^*$ )的寡聚物杂交至 DNA, RNA 或另一 LNA 时将会引起的平行方向定位取向。

鉴于以上所述，应考虑到在寡聚物中“正常”LNAs 和木-LNAs 的结合能够产生有趣的特性，只要这些不同类型的单体位于区域中，即使包含至少 5 个，如至少 10 个单体(例如木-LNA，木核苷酸等单体)的未中断区域被包含至少 5 个，如至少 10 个其他的类型(例如“正常”LNA，“正常”核苷酸等)的单体的未中断区域接随等。此嵌合类型的寡聚物可以，例如用来捕捉核酸。

本文中，术语“单体”涉及自然产生的核苷酸，非-自然产生的核苷酸，PNAs，LNAs 等。因此，“下一个单体”指 5'-末端方向的相邻单体，“前一个单体”指 3'-末

端方向的相邻单体。此下一个单体和前一个单体，是以 LNA 单体的位置为参考的，可为自然产生的核苷酸或非-自然产生的核苷酸，而且甚至为 LNA 单体。

因此，本文中(可由上述定义衍生而来)，术语“寡聚物”意指一经由合并一个或多个 LNA(s)修饰的寡核苷酸。

本文中，双游离基( $R^{2*}-R^{4*}$ )的方向为左-手侧表示具有数目最小的取代基而右手侧表示具有数目最大的取代基，因此，当  $R^{2*}$  和  $R^{4*}$  共同指双游离基“-O-CH<sub>2</sub>”，应理解氧原子代表  $R^{2*}$ ，从而该氧原子，例如连接至  $R^{2*}$  的位置，且亚甲基代表  $R^{4*}$ 。

就合并入寡聚物中 LNA(s)的双游离基 ( $R^{2*}-R^{4*}$ ) 的结构的多种有趣的可能而论，相信该双游离基优选选自 -(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)-Y-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>s</sub>-， -(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r</sub>-Y-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>s</sub>-Y-， -Y-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s</sub>-Y-， -Y-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r</sub>-Y-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>s</sub>-， -(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s</sub>-， -Y-， -Y-Y-， 其中各 Y 独立地选自-O-， -S-， -Si(R<sup>•</sup>)<sub>2</sub>-， -N(R<sup>•</sup>)-， >C=O， -C(=O)-N(R<sup>•</sup>)-， 和-N(R<sup>•</sup>)-C(=O)-， 其中各 R<sup>•</sup> 独立地选自氢， 卤素， 叠氮基， 氰基， 硝基， 羟基， 硫基， 氨基， 单-或双(C<sub>1-6</sub>-烷基)氨基， 任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷氧基， 任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷基， DNA 嵌入剂， 光化学活性基团， 热化学活性基团， 融合基， 报道基因， 和配体，并且/或者两相邻(非双)R<sup>•</sup>可共同指定一双键；且 r 和 s 各为 0-4，条件是 r+s 的总和为 1-4。特别值得关注的情况是其中双游离基是选自-Y-， -(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s</sub>-， -(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r</sub>-Y-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>s</sub>-， 和-Y-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s</sub>-Y-的那些基团，其中 r 和 s 各为 0-3，条件是 r+s 的和为 1-4。

特别值得关注的寡聚物是其中寡聚物的至少一种 LNA 的 R<sup>2\*</sup> 和 R<sup>4\*</sup> 共同指定选自-O-， -S-， -N(R<sup>•</sup>)-， -(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s+1</sub>-， -(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r</sub>-O-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>s</sub>-， -(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r</sub>-S-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>s</sub>-， -(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r</sub>-N(R<sup>•</sup>)-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>s</sub>-， -O-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s</sub>-O-， -S-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s</sub>-O-， -O-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s</sub>-S-， -N(R<sup>•</sup>)-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s</sub>-O-， -O-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s</sub>-N(R<sup>•</sup>)-， -S-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s</sub>-S-， -N(R<sup>•</sup>)-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s</sub>-N(R<sup>•</sup>)-， -N(R<sup>•</sup>)-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s</sub>-S-， 和-S-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s</sub>-N(R<sup>•</sup>)-的双游离基。

更优选的 R<sup>•</sup> 选自氢， 羟基， 任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷氧基， 任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷基， DNA 嵌入剂， 光化学活性基团， 热化学活性基团， 融合基， 报道基因， 和配体，并且任何剩余取代基 R<sup>•</sup> 为氢。

对一优选的变量，至少一个 LNA 的双游离基的 R<sup>•</sup> 基团选自 DNA 嵌入剂，光化学活性基团，热化学活性基团，融合基，报道基因，和配体(其中后面的基团可包括如对取代基 B 所定义的间隔物)。

优选地，存在的且不含于 P 或 P\* 中的 LNA(s)的取代基 R<sup>1\*</sup>， R<sup>2</sup>， R<sup>3</sup>， R<sup>3\*</sup>， R<sup>5</sup>， R<sup>6</sup>， R<sup>6\*</sup>， 各自独立地选自氢， 任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷基， 任选取代的 C<sub>2-6</sub>-链烯基， 羟基， C<sub>1-6</sub>-烷氧基， C<sub>2-6</sub>-烯氧基， 羧基， C<sub>1-5</sub>-烷氧羰基， C<sub>1-6</sub>-烷基羰基， 甲酰基， 氨基， 单-和双(C<sub>1-6</sub>-烷基)氨基， 氨基甲酰基， 单-和双(C<sub>1-6</sub>-烷基)-氨基-羰基， C<sub>1-6</sub>-烷基-羰基氨基， 肽基， 叠氮基， C<sub>1-6</sub>-烷酰氧基， 碘酰基， 亚碘酰基， C<sub>1-6</sub>-烷硫基， DNA 嵌入剂， 光化学活性基团， 热化学活性基团， 融合基， 报道基因， 和配体， 和卤素， 其两个双取代基可共同指定氧代，且当 R<sup>N\*</sup> 存在且不为双游离基时，选自卤素和 C<sub>1-4</sub> 烷基。

在 LNAs 的优选的变量中, X 选自-O-, -S-, 和-NR<sup>N\*</sup>-, 尤其为-O-, 并且存在且不含于 P 或 P\* 中的 LNA(s) 的各取代基 R<sup>1\*</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>3\*</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>5\*</sup>, R<sup>6</sup> 和 R<sup>6\*</sup> 指卤素。

在更优选的变量中, X 为 O, R<sup>2</sup> 选自氢, 羟基, 和任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷氧基, R<sup>3</sup> 与 R<sup>3\*</sup> 之一为 P\* 而另一个为氢, 和 R<sup>1\*</sup>, R<sup>5</sup> 与 R<sup>5\*</sup> 指氢, 更确切地, 该双游离基 (R<sup>2\*</sup>-R<sup>4\*</sup>) 选自 -O-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-1</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-1</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-1</sub>-N(R<sup>N</sup>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-, 和 -(CH<sub>2</sub>)<sub>2-4</sub>-, 尤其选自 -O-CH<sub>2</sub>-, -S-CH<sub>2</sub>-, 和 -NR<sup>H</sup>-CH<sub>2</sub>-。一般, 由于具有目前获得的结果, 优选地, 构成 R<sup>2\*</sup> 和 R<sup>4\*</sup> 的双游离基形成两碳原子桥, 亦即双游离基形成具有呋喃糖环 (X=O) 的五元环。特别关注的也为那些寡聚物, 其中式 I 中合并的 LNA 中的 R<sup>2\*</sup> 和 R<sup>4\*</sup> 共同指选自 -O-CH<sub>2</sub>-, -S-CH<sub>2</sub>-, 和 -NR<sup>H</sup>-CH<sub>2</sub>- 的双游离基; X 为 O, B 指选自腺嘌呤, 鸟嘌呤, 胸腺嘧啶, 胞嘧啶和尿嘧啶的核碱基; R<sup>2</sup> 为氢, R<sup>3</sup> 或 R<sup>3\*</sup> 之一指 P\*, 另一个为氢, R<sup>1\*</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup>, 和 R<sup>5\*</sup> 指氢。

在这些实施方案中, 更优选的为并入寡聚物中的至少一个 LNA 包括选自腺嘌呤和鸟嘌呤的核碱基(取代基 B)。尤其是, 具有 LNA 并入其中的寡聚物包括至少一个选自胸腺嘧啶, 尿嘧啶和胞嘧啶的核碱基和至少一个选自腺嘌呤和鸟嘌呤的核碱基。至于 LNA 单体, 尤其优选的为核碱基选自腺嘌呤和鸟嘌呤。

在这些关注的具体实施方案中, 寡核苷酸的所有单体为 LNA 单体。

由通式 I(寡聚物中的 LNA(s))和与之相关的定义, 依据取代基的特性和可能的双游离基如下所示, 寡聚物中可能存在一到数个不对称碳原子。

在一个变量中, R<sup>3\*</sup> 指 P\*。在另一个变量中 R<sup>3</sup> 指 P\*, 在第三个变量中, 在一些 LNAs 中 R<sup>3\*</sup> 指 P\*, 在寡聚物中其它的 LNAs 的 R<sup>3</sup> 指 P\*。

一般的寡聚物包括 1-10000 个通式 I 的 LNA(s) 和 0-10000 个选自自然产生的核苷和核苷类似物的核苷。核苷酸数目和 LNA(s) 数目的总和至少为 2, 优选至少为 3, 特别至少为 5, 尤其至少为 7, 例如在 2-15000 的范围, 优选在 2-100 的范围, 如 3-100, 特别为 2-50 的范围, 如 3-50 或 5-50 或 7-50。

在本文中, 术语“核苷”指杂环碱基的糖苷。术语“核苷”广泛的使用于包括非-自然产生的核苷, 自然产生的核苷与其它核苷类似物。有关核苷的说明性的例子为包含核糖部分的核糖核苷和包含脱氧核糖部分的脱氧核糖核苷。关于该种核苷的碱基, 应了解其可能为任何自然发生的碱基例如腺嘌呤, 鸟嘌呤, 胞嘧啶, 胸腺嘧啶, 和尿嘧啶和任何修饰的变体或任何可能的非自然碱基。

当考虑核苷的定义与已知的核苷(自然产生和非-自然产生)和核苷类似物(包括已知的双-与三环类似物)时, 显然地, 寡聚物可以包括一个或多个 LNA(s)(由于所选择的取代基和所选择的双游离基, 其可能相同或不同)和一个或多个核苷和/或核苷类似物。本文中“寡核苷酸”指由通过核苷间键合所连接的连续链的核苷; 然而, 应理解寡聚物(寡核酸)中一个或多个核苷酸单位(单体)的核碱基可以被上述所定义

的取代基 B 修饰。

如上文所提及, 寡聚物的 LNA(s)通过核苷间键合与其它单体连结。本文中“核苷间键合”指由 2 到 4, 优选为 3 个选自-CH<sub>2</sub>-、-O-、-S-、-N(R<sup>H</sup>)-、>C=O、>C=NR<sup>H</sup>、>C=S、-Si(R")<sub>2</sub>-、-SO-、-S(O)<sub>2</sub>-、-P(O)<sub>2</sub>-、-PO(BH<sub>3</sub>)-、-P(O,S)-、-P(S)<sub>2</sub>-、-PO(R")-、-PO(OCH<sub>3</sub>)-, 和-PO(NHR<sup>H</sup>)-的基团/原子所组成的键合, 其中 R<sup>H</sup>选自氢和 C<sub>1-4</sub> 烷基, 和 R" 选自 C<sub>1-6</sub> 烷基和苯基。该种核苷间键合的说明性的例子为:

-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>-CO-CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>-、O-CH<sub>2</sub>-O-、-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-O-CH<sub>2</sub>-CH= (当作为与下一个单体的键合时包括 R<sup>5</sup>)、-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-、-NR<sup>H</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-、-CH<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-CH<sub>2</sub>-、-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-、-NR<sup>H</sup>-CO- O-、-NR<sup>H</sup>-CO- NR<sup>H</sup>-、-NR<sup>H</sup>-CS- NR<sup>H</sup>-、-NR<sup>H</sup>-C(=NR<sup>H</sup>)- NR<sup>H</sup>-、-NR<sup>H</sup>-CO-CH<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-、-O-CO-O-、-O-CO-CH<sub>2</sub>-O-、-O-CH<sub>2</sub>-CO-O-、-CH<sub>2</sub>-CO-NR<sup>H</sup>-、-O-CO-NR<sup>H</sup>-、NR<sup>H</sup>-CO-CH<sub>2</sub>-、-O-CH<sub>2</sub>-CO--NR<sup>H</sup>、-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>、-CH=N-O-、-CH<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-O-、-CH<sub>2</sub>-O-N= (当作为与下一个单体的连接时包括 R<sup>5</sup>)、-CH<sub>2</sub>-O-NR<sup>H</sup>-、-CO-NR<sup>H</sup>-O-CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-O-、-CH<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-CO-、-O-NR<sup>H</sup>-CH<sub>2</sub>-、-O-NR<sup>H</sup>-、-O-CH<sub>2</sub>-S-、-S-CH<sub>2</sub>-O-、-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-、-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-、-S-CH<sub>2</sub>-CH= (当作为对与下一个单体的连接时包括 R<sup>5</sup>)、-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-、-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-、-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>-SO-CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-O-SO-O-、-O-S(O)<sub>2</sub>-O-、-O-S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-O-S(O)<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-、-NR<sup>H</sup>-S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-O-S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-O-P(O)<sub>2</sub>-O-、-O-P(O,S)-O-、-O-P(S)<sub>2</sub>-O-、-S-P(O)<sub>2</sub>-O-、-S-P(O,S)-O-、-S-P(S)<sub>2</sub>-O-、-O-P(O)<sub>2</sub>-S-、-O-P(O,S)-S-、-S-P(O)<sub>2</sub>-S-、-S-P(O,S)-S-、-S-P(S)<sub>2</sub>-S-、-O-PO(R")-O-、-O-PO(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)-O-、-O-PO(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S-R)-O-、-O-PO(BH<sub>3</sub>)-O-、-O-PO(NHR<sup>H</sup>)-O-、-O-P(O)<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-、-NR<sup>H</sup>-P(O)<sub>2</sub>-O-、-O-P(O, NR<sup>H</sup>)-O-、-CH<sub>2</sub>-P(O)<sub>2</sub>-O-、-O-P(O)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、和-Si(R")<sub>2</sub>-O-、其中优选的是-CH<sub>2</sub>-CO-NR<sup>H</sup>-、-CH<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-O-、-S-CH<sub>2</sub>-O-、-O-P(O)<sub>2</sub>-O-、-O-P(O,S)-O-、-O-P(S)<sub>2</sub>-O-、-NR<sup>H</sup>-P(O)<sub>2</sub>-O-、-O-P(O, NR<sup>H</sup>)-O-、-O-PO(R")-O-、-O-PO(CH<sub>3</sub>)-O-、和-O-PO(NHR<sup>H</sup>)-O-, 其中 R<sup>H</sup> 选自氢和 C<sub>1-4</sub> 烷基, R" 选自 C<sub>1-6</sub> 烷基和苯基。Mesmaeker 等人的 Current Opinion in Structural Biology 1995, 5, 343-355 中进一步提出了说明性的例子。核苷间左手侧的键合与 5'-元环以取代基 P\*结合, 而右手侧与前一个单体的 5'-位结合。

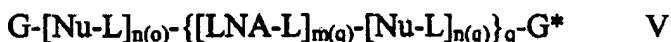
由上述说明很清楚当讨论中的 LNA 为 5'-末端的单体时, P 基团也可指 5'-端基。这种 5'-端基的实例有氢、羟基、任选取代的 C<sub>1-6</sub> 烷基、任选取代的 C<sub>1-6</sub> 烷氧基、任选取代的 C<sub>1-6</sub> 烷基碳氧基、任选取代的芳氧基、单磷酸根、双磷酸根、三磷酸根、和-W-A'-, 其中 W 选自-O-、-S-、和-N(R<sup>H</sup>)-, 而 R<sup>H</sup> 选自氢和 C<sub>1-6</sub> 烷基, A' 选自 DNA 嵌入物, 光化学活性基团, 热化学活性基团, 融合基, 报道基因, 和配体(其中后面的基团可包含如对取代基 B 所定义的间隔物)。

于本文的说明和权利要求中, “单磷酸根”, “双磷酸根”, 和“三磷酸根”分别指下式的基团: -O-P(O)<sub>2</sub>-O<sup>-</sup>、-O-P(O)<sub>2</sub>-O-P(O)<sub>2</sub>-O<sup>-</sup>、和-O-P(O)<sub>2</sub>-O-P(O)<sub>2</sub>-O-P(O)<sub>2</sub>-O<sup>-</sup>。

在特别关注的实施方案中，基团 P 指选自单磷酸根、双磷酸根和三磷酸根的 5'-端基。尤其关注的是三磷酸根的变异物作为核酸聚合酶的底物。

相似地，当讨论中的 LNA 为 3'-末端的单体时，该 P\* 基团可指 3'-端基。这种 3'-端基的实例有氢、羟基、任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷氧基、任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷基羰氧基、任选取代的芳氧基、和-W-A'-，其中 W 选自-O-、-S-和-N(R<sup>H</sup>)-而，R<sup>H</sup> 选自氢和 C<sub>1-6</sub>-烷基，A' 选自 DNA 嵌入物，光化学活性基团，热化学活性基团，螯合基，报道基因和配体(其中后面基团可包含如取代基 B 所定义的间隔物)。

优选的 LNA(s)的变异物，其寡聚物具有下列通式 V:



其中

q 为 1 到 50;

n(0), ..., n(q)各自独立地为 0 到 10000;

m(1), ..., m(q)各自独立地为 1 到 10000;

条件是 n(0), ..., n(q)和 m(1), ..., m(q)的总和为 2 到 15000;

G 指 5'-端基;

Nu 各自独立地指选自自然产生的核苷和核苷类似物的核苷;

LNA 各自独立地指核苷类似物;

L 各自独立地指选自 Nu 和 LNA 两基团之间的核苷间键合，或 L 与 G\*一起指 3'-端基；和

LNA-L 各自独立地指上述所定义的通式 I 的核苷类似物。

在该变异物中，一般地，LNAs 优选包括不同的核碱基，特别是选自胸腺嘧啶，胞嘧啶和尿嘧啶的核碱基和选自腺嘌呤和鸟嘌呤的核碱基。

该寡聚物也打算包括嵌合寡聚物。术语“嵌合寡聚物”意指两个或多个寡聚物带有不同来源直接或由间隔物连接的单体。可结合的该寡聚物说明性的例子有肽，PNA-寡聚物，含有 LNAs 的寡聚物，和寡核苷酸寡聚物。该具有非-LNA(R<sup>3</sup>=P\*)区域和“正常”LNA(R<sup>3</sup>=P\*)区域的寡聚物的结合可构成作为嵌合寡聚物的例子，因为各个区域可具有不同的亲和性和特异的结构。

一般地，以亲和力和特异性而言该寡聚物具有惊人地良好的杂交特性。因此，该寡聚物含有至少一种核苷类似物，该核苷类似物赋予该具有一个互补 DNA 的寡核苷酸的寡聚物较高的 T<sub>m</sub>，该 T<sub>m</sub> 比不含有任何核苷类似物的相应的未经修饰的对照寡核苷酸至少高 2.5°C，优选为至少高 3.5°C，特别则至少高 4°C，尤其至少高 5°C。尤其是该寡聚物的 T<sub>m</sub> 至少提高 2.5 x N°C，优选为至少提高 3.5 x N°C，特别则至少提高 4 x N°C，尤其至少提高 5 x N°C，其中 N 为核苷类似物的数目。

在与互补 RNA 寡核苷酸的杂交中，至少一种核苷类似物赋予该具有互补 DNA 寡核酸的寡聚物较高的 T<sub>m</sub>，该 T<sub>m</sub> 比相应的未经修饰的不含有任何核苷类似物的对照的寡核苷酸至少高 4°C，较佳为至少高 5°C，较特别则至少高 6°C，尤其至少

高 7°C。尤其是该寡聚物的  $T_m$  至少是提高  $4 \times N^{\circ}C$ ，较佳者为至少提高  $5 \times N^{\circ}C$ ，较特别则至少提高  $6 \times N^{\circ}C$ ，尤其至少提高  $7 \times N^{\circ}C$ ，其中  $N$  为核苷类似物的数目。

术语“相应的未经修饰的对照寡核苷酸”指寡核苷酸只包括自然产生的核苷酸，其在相同的绝对顺序(和相同的方向)表示相同的核碱基。

该  $T_m$  在下列条件之下测得：

- a) 10mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.0, 100mM NaCl, 0.1mM EDTA;
- b) 10mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.0, 0.1mM EDTA; 或
- c) 3M 四甲基氯化铵(TMAC), 10mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.0, 0.1mM EDTA;

等摩尔量(一般为 1.0  $\mu\text{M}$ )的寡聚物和互补 DNA 寡核苷酸时, 优选 a) 条件。

该寡聚物优选如上所定义, 至少一种核苷类似物具有通式 I, 其中 B 为核碱基。特别有趣的是至少一种核苷类似物包括选自腺嘌呤和鸟嘌呤的核碱基的情况。

再者，有关特异性和亲和力，当该寡聚物与部份互补的 DNA 寡核苷酸杂交或与部份互补 RNA 寡核苷酸杂交时，含有一个或多个与该寡聚物错误的配对，将因该错误的配对而呈现出  $T_m$  减少，该结果系相等或大于相应的未含有任何核苷类似物的未经修饰的对照核苷酸其所观察到  $T_m$  的减少。同样地，该寡聚物对杂交缓冲液中离子强度与相应的未经修饰的对照核苷酸一样具有相同的  $T_m$  敏感性。

这里所定义的寡聚物为通常至少有 1% 经过修饰，如至少 2% 经过修饰，例如 3% 经过修饰，4% 经过修饰，5% 经过修饰，6% 经过修饰，7% 经过修饰，8% 经过修饰，或 9% 经过修饰，至少 10% 经过修饰，例如至少 11% 经过修饰，例如 12% 经过修饰，13% 经过修饰，14% 经过修饰，或 15% 经过修饰，至少 20% 经过修饰，例如至少 30% 经过修饰，至少 50% 经过修饰，例如 70% 经过修饰，和在一些有趣的应用中 100% 经过修饰。

优选寡聚物比相应的未经修饰的对照寡核苷酸具有更高的 3'-核外分解稳定性。

应了解该寡聚物(其中 LNAs 被并入的)和 LNAs 包括其盐类, 其中药理学上可接受盐类尤其重要。盐类包括酸加成盐和碱性盐。例如, 酸加成盐的实例有盐酸盐, 钠盐, 钙盐, 钾盐等。碱性盐的例子是这样的盐, 其中(残余)相反离子选自碱金属, 如钠和钾, 碱土金属, 如钙, 和铵离子( $\text{N}(\text{R}^{\text{g}})_3\text{R}^{\text{h}}$ , 其中各个  $\text{R}^{\text{g}}$  和  $\text{R}^{\text{h}}$  独立地指向选取代的  $\text{C}_{1-6}$ -烷基, 任选取代的  $\text{C}_{2-6}$ -链烯基, 任选取代的芳基, 或任选取代的的杂芳基)。药理学上可接受盐为, 例如详述于 Remington's Pharmaceutical Science, 17. Ed. Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mack Publishing Company, Easton, PA, U.S.A., 1985 和较近版本和于 Encyclopedia of Pharmaceutical Technology 中的那些。因此, 这里所用的短语“其酸加成盐或碱性盐”包含该种盐类。再者, 该寡聚物、LNAs 和任何中间产物或起始物都可以水合物形式存在。

## 附图说明

### 图 1

说明本发明的一个实施方案。

图 1-1 杂交实验以 3 种不同 LNA 修饰的寡体(参见表 1-1)共价固定于一微滴定盘的井孔和互补性的靶 DNA 寡体进行。该杂交在各种不同浓度的盐酸胍(GnHCl)下按指示进行。

### 图 2-1

在不同浓度的盐酸胍下进行说明 LNA 杂交特异性的竞争实验分析。当竞争性寡体(一种碱基错误配对的突变型寡体)浓度在 0.1nM 到 0.3 $\mu$ M 范围中变化时, 野生型寡体配对的量维持恒定: 0.5nM。箭头指示相等摩尔量的靶寡体和竞争寡体。也指出在含有 0 到 8M 盐酸胍(GnHCl)的杂交缓冲液中获得的杂交进行情况。

### 图 2-2

在不同浓度的盐酸胍下进行说明 LNA 杂交特异性的竞争实验分析。当竞争性寡体(一种碱基错误配对的野生型寡体)浓度在 0.1nM 到 0.3 $\mu$ M 范围中变化时, 突变型寡体配对的量维持恒定浓度 0.5nM。箭头指示相等摩尔量的靶寡体和竞争寡体。也指出了在含有 0 到 8M 盐酸胍(GnHCl)的杂交缓冲液中获得的杂交进行情况。

### 图 3-1

LNA 杂交实验以 2 种不同 LNA 修饰的寡体(参见表 3-1)共价固定于一微滴定盘的井孔和两个互补性的靶DNA 寡体进行。该杂交在各种不同浓度的硫氰酸胍(GnSCN)下和基于柠檬酸钠或磷酸钠的缓冲液中按指示进行。

### 图 4-1

在基于磷酸盐的缓冲液和不同浓度的硫氰酸胍(GnSCN)下进行说明杂交特异性的竞争实验分析。当竞争性寡体(一种碱基错误配对的突变型寡体)浓度在 0.1nM 到 0.3 $\mu$ M 范围中变化时, 野生型寡体配对的量维持恒定浓度 0.5nM。箭头指示相等摩尔量的靶寡体和竞争性寡体。也指出在含有 0 到 4M GnSCN 杂交缓冲液中获得的杂交进行情况。

### 图 4-2

在基于磷酸盐的缓冲液和不同浓度的硫氰酸胍(GnSCN)下进行说明杂交的特异性的竞争实验分析。当竞争寡体(一种碱基错误配对的野生型寡体)浓度在 0.1nM 到 0.3 $\mu$ M 范围中变化时, 突变型寡体配对的量维持恒定浓度 0.5nM。箭头指示相等摩尔量的靶寡体和竞争性寡体。也指出在含有 0 到 4M GnSCN 的杂交缓冲液中获得的杂交进行情况。

### 图 4-3

在柠檬酸钠基缓冲液和不同浓度的硫氰酸胍(GnSCN)下进行说明杂交的特异性的竞争实验分析。当竞争性寡体(一种碱基错误配对的突变型寡体)的浓度在 0.1nM 到 0.3 $\mu$ M 范围中变化时, 野生型寡体配对的量维持恒定浓度 0.5nM。箭头指示相等摩尔量的靶寡体和竞争性寡体。也指出在杂交含有 0 到 4M 硫氰酸胍(GnSCN) 杂交

缓冲液中获得的杂交进行情况。

#### 图 4-4

在基于柠檬酸钠的缓冲液和各种不同浓度的硫氰酸胍(GnSCN)下进行说明杂交的特异性的竞争实验分析。当竞争性寡体(一种碱基错误配对的野生型寡体)浓度在 0.1nM 到 0.3μM 范围中变化时, 突变型寡体配对的量维持恒定浓度 0.5nM。箭头指示相等摩尔量的靶寡体和竞争性寡体。也指出杂交含有 0 到 4M GnSCN 的杂交缓冲液中获得的杂交。

#### 图 6-1

单一核苷酸多型性的检测。产生出由三种人类细胞系(HCV29, T112C1 和 T112D1)而来的生物素化的 PCR 复制子和质粒。所有三种人类细胞系均为有关 ApoB3500 突变的野生型(G-等位基因)。“A-等位基因”质粒含有 ApoB R3500Q 突变(在氨基酸 3500 中(精氨酸(arg) → 谷氨酰胺(gln))G → A 转换)。抗野生型(C8)或突变型(T8)特异性的 LNA 捕捉探抗各样品进行测试。黑色柱状: 野生型。淡色柱状: 突变型。

#### 图 7-1

在细菌细胞的溶解物中检测质粒DNA。将三种不同种的细菌菌株(参见表 7-1)溶解, 并分别与共价固定于一微滴定盘的井孔的 C11 或 T11 捕捉探针杂交(参见表 7-2)。该杂交在含有 2M 硫氰酸胍的杂交缓冲液中进行。NF1815 细胞不含质粒, TOP10/pCR 细胞含有不含 ApoB 序列的 pCR®2.1-TOPO 质粒并且 TOP10/pApoBwt 细胞含有插入至 pCR®2.1-TOPO 质粒的中 ApoB3500 野生-型序列。

#### 实施例 1

##### GnHCl 使得磷酸缓冲液中的 LNA 杂交能够进行且促使其进行

为了研究强离液剂如盐酸胍 (GnHCl) 在杂交中的作用, 进行以下实验。

经 LNA 修饰的带有 5'为葸醌的寡体(参见表 1-1)经 UV(紫外线)照射共价固定于一微滴定盘的小孔, 在与互补性靶 DNA 寡体的杂交分析中用作捕捉探针。该杂交物质通过杂交混合物中含有的 5' 生物素化的 DNA 检测探针检测。

表 1-1: 研究的寡核苷酸

名称	EQ 数	SEQ ID NO	序列	特征
C8	EQ-3133	4	5'-AQ-tac atg tta tgc ttt GAC <sup>met</sup> <u>C<sup>met</sup></u> GT GTg-3'	5' 蔗醣修饰的 LNA
C11	EQ-3131	5	5'-AQ-tac atg tta tgc ttt AAG AC <sup>met</sup> <u>C<sup>met</sup></u> GTG TGc-3'	5' 蔗醣修饰的 LNA
HEG C8	EQ-3108	6	5'-AQ-HEG-AGA <u>C<sup>met</sup></u> CG TGt-3'	5' 六甘醇 LNA
野生型靶分子	WQ-3185	7	5'ttg aat tcc aag agc aca cgg tct tca gtg aag ctg cag ggc act tcc aa 3'	野生型, 有意义 g/c pox. 9756 (50-mer)
检测探针	EQ-3246	8	5'-生物素-ttg gaa gtg ccc tgc agc tt-3'	5' 生物素化的 DNA

注: LNA 单体以大写字母表示, DNA 单体以小写字母表示。C<sup>met</sup> 指单体是 5-甲基胞嘧啶 LNA。5'-AQ 指该寡体带有一 5' 蔗醣(AQ)和一 C3 接头, 该组成为 AQ-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>- 寡体。5'-AQ-HEG 指该寡体 5' 端为 AQ-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-PO<sub>4</sub>-((CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O)<sub>5</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-寡体。5'-生物素指该寡体 5' 端为: 生物素-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-寡体。

#### 固定 ApoB 捕捉探针:

蔗醣 LNA 捕捉探针(不论是 C8, C11 或 HEG C8-参见表 1-1)以浓度为 0.1μM 溶于 0.2M NaCl 中。将 100μL 的寡体加入到各微滴定盘的井孔(C96 polysorp; Nalge Nunc International, Roskilde, Denmark), 用 ULS-20-2 照明器在最大温度 35°C 时在温和的 UV 光下(约 350nm)照射 15 分钟。该照明器配有 28 个菲利浦 Cleo 小型 25W-S 亮度灯管(14 个在样品架玻璃板的上方, 14 个在下方); 只使用上方的灯管。

孵化后, 先以 300μL 含有 0.25% Tween 20(Riedel-de Haen, Seelze, Germany)的 0.4M NaOH 清洗, 再以 300μL 去离子水清洗三次。

#### 与靶探针和检测探针进行杂交:

将野生型(WT)靶分子(0.3μM, EQ3185, SEQ ID NO 7)加入至覆有 C8, C11 或 HEG C8 捕捉探针的微滴定盘的井孔中。杂交混合物中 GnHCl 的浓度如下述的方法以两倍"稀释"变化。所得 GnHCl 的浓度为: 0.0078、0.016、0.032、0.063、0.13、0.25、0.5、1、2、4 和 8M。

将固体的 GnHCl 溶解到 pH7, 含有 0.1% 的 Tween 20r 50mM 磷酸盐缓冲液中, 得到含有 8M 最终浓度 GnHCl 的杂交缓冲液。含有较低浓度的 GnHCl 缓冲液以含有 0M GnHCl 的相似缓冲液稀释含有 8M GnHCl 的缓冲液得到。

取 100μL 的杂交混合物加入各个微滴定盘的井孔中。使得捕捉寡体和靶寡体在 37°C 下进行半小时的杂交。然后将井孔以 300μL 的含有 0.1% Tween 20 的 1x

SSC 清洗 5 次(1x SSC 为: 150mM NaCl, 15mM 柠檬酸钠)。然后将溶于含有 0.1% Tween 20 的 1x SSC 的 100 $\mu$ L 0.12 $\mu$ M 的检测探针(EQ-3246, SEQ ID NO 8)加入, 并且在 37°C 下进行半小时的杂交。最后将该微滴定盘以含有 0.1% Tween 20 的 1x SSC 清洗三次。

该杂交物以链霉抗生物素-辣根过氧化物酶(strA-HRP)连接至生物素化的检测探针而进行检测。该 strA-HRP(Pierce, Rockford, IL, USA. Cat no. 21126)以浓度为 1 $\mu$ g/mL 溶于含有 0.1% Tween 20 的 1x SSC 中。取 100 $\mu$ L 加入至各个井孔中且孵化 15 分钟。之后将该微滴定盘以含有 0.1% Tween 20 的 1x SSC 清洗三次, 使用 OPD-分析法显示该信号。

#### OPD-分析:

制备含有 6mL pH=5.0 的 0.1M 柠檬酸盐缓冲液、两片 2mg 的邻苯二胺(OPD) 片剂(Kem-En-Tech, Copenhagen, Denmark)和 2.5 $\mu$ L 30% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的主-混合物。将 100 $\mu$ L 的主-混合物加入各个反应槽, 然后根据酶的活性孵化 1 至 30 分钟。用 100 $\mu$ L 0.5M 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止该分析, 然后用 ELISA 读数器于  $\lambda=492$  nm 测量光密度。

#### 结果:

结果显示于图 1-1 中。

#### 结论:

从上述实验可得出以下结论: 可在含有 GnHCl 的缓冲液中进行效率良好的杂交。令人惊奇地观察到, 该杂交信号会随着 GnHCl 浓度的增加而增强。甚至在很高的 GnHCl 浓度 (8M) 时, 仍可获得高杂交信号。事实上, 对于含有 DNA-接头(C8(EQ-, SEQ ID NO 5) 和 C11(EQ-3131, SEQ ID NO 5))的捕捉寡体, 其杂交信号作为 GnHCl 浓度的函数而增加可增至 30% (从 0.1M 时开始于约 0.5M 到 5M 之间最为理想)。通过六甘醇接头 (HEG C8 (EQ-3108, SEQ ID NO 6)) 固定于微滴定盘的表面的捕捉探针的杂交则较少受到影响。

## 实施例 2

### GnHCl 中的杂交特异性(竞争实验)

为了研究在含有强离液剂如盐酸胍(GnHCl) 的缓冲液中, 杂交是否能表现出足够高地严格性使得单一碱基可以分离出来, 进行下列实验。

带有 5' 葡萄糖的经 LNA 修饰的寡体(参见表 2-1)经 UV(紫外线)照射而共价固定于一微滴定盘的井孔, 在与互补性靶 DNA 寡体的杂交分析中用作捕捉探针。该杂交物的检测是通过在杂交混合物中加入 5' 为生物素化的 DNA 检测探针进行的。

表 2-1：研究的寡核苷酸

名称	EQ 数	SEQ ID NO	序列	特征
C8	EQ-3133	4	5'-AQ-tac atg tta tgc ttt GAC <sup>met</sup> C <sup>met</sup> GT GTg-3'	5' 葡萄糖修饰的 LNA
T8	EQ-3134	9	5'-AQ-tac atg tta tgc ttt GAC <sup>met</sup> TGT GTg-3'	5' 葡萄糖修饰的 LNA
野生型 靶分子	EQ-3185	7	5'ttg aat tcc aag agc aca cggtcttca gttt aag ctg cag ggc act tcc aa 3'	野生型, 有意 义 g/c pos. 9756 (50-mer)
突变型 靶分子	EQ-3187	10	5'ttg aat tcc aag agc aca cggtcttca gttt aag ctg cag ggc act tcc aa 3'	有意义 a/t pos. 9756 (50-mer)
检测探 针	EQ-3246	8	5'-生物素-ttg gaa gttt ccc tgc agc tt-3'	5' 生物素化的 DNA

注：LNA 单体以大写字母标识，DNA 单体以小写字母标识。C<sup>met</sup> 系指单体是 5-甲基胞嘧啶 LNA。5'-AQ 指该寡体带有 5' 葡萄糖(AQ)和 C3 接头，该组成为 AQ-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-寡体。5'-生物素指该寡体 5' 端为：生物素-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-寡体。

固定 ApoB 捕捉探针：

将葡萄糖 LNA 捕捉探针(不论是 C8 或 T8-参见表 2-1)溶于 0.2M NaCl 中而使其浓度为 0.1μM。取 100μL 加入到各微滴定盘的井孔(C96 polysorp; Nalge Nunc International, Roskilde, Denmark)，并且用 ULS-20-2 照明器在最大温度 35℃ 时用温和的 UV 光(约 350nm)照射 15 分钟。该照明器配有 28 个飞利浦 Cleo 小型 25W-S 亮度灯管(14 个在样品架玻璃板的上方，14 个在下方)；本试验只使用上方的灯管。

经孵化后，先以 300μL 的含有 0.25% Tween 20(Riedel-de Haen, Seelze, Germany) 的 0.4M NaOH 清洗，然后再以 300μL 去离子水清洗三次。

与野生型靶分子(EQ-3185)和突变型靶分子(EQ-3187)进行杂交：

将野生型靶分子(EQ3185, SEQ ID NO 7)以恒定的低浓度(0.0005μM)加入至覆有 C8 捕捉探针(EQ 3133, SEQ ID NO4)的微滴定盘的井孔中，而竞争的单一碱基错配突变型靶分子的量以五倍“稀释系列”变化。所得到的突变型靶分子的浓度为：0.0001, 0.0005, 0.0025, 0.012, 0.06 和 0.30μM。

将突变型靶分子以恒定的低浓度(0.005μM)加入至覆有 T8 捕捉探针(EQ 3134, SEQ ID NO 9)的井孔中，而竞争的单一碱基错配野生型靶分子(EQ3185, SEQ ID NO 7)的量以五倍“稀释系列”变化。所得到的野生型靶分子的浓度为：0.0001, 0.0005, 0.0025, 0.012, 0.06 和 0.30μM。

将固体的 GnHCl 溶解到 pH7, 含有 0.1% 的 Tween 20 的 50 $\mu$ M 磷酸盐缓冲液中, 得到含有 8M 最终浓度 GnHCl 的杂交缓冲液。含有较低浓度的 GnHCl 缓冲液通过以含有 0M GnHCl 的相似缓冲液稀释含有 8M GnHCl 的缓冲液而得到。

取 100 $\mu$ L 的杂交混合物加入每个微滴定盘的井孔中。捕捉寡体和靶寡体于 37 °C 下进行半小时的杂交。然后以 300 $\mu$ L 的含有 0.1% Tween 20 的 1xSSC 清洗该井孔 5 次(1xSSC 为 150mM NaCl, 15mM 柠檬酸钠)。然后, 将 100 $\mu$ L 0.12 $\mu$ M 溶于含有 0.1% Tween 20 的 1x SSC 中的检测探针(EQ-3246, SEQ ID NO 8)加入, 并且于 37°C 时进行半小时的杂交。最后该微滴定盘以含有 0.1% Tween 20 的 1x SSC 清洗三次。

该杂交物以链霉抗生物素-辣根过氧化物酶(strA-HRP)连接至生物素化的检测探针而检测的。该 strA-HRP(Pierce, Rockford, IL, USA. Cat no. 21126)溶于含有 0.1% Tween 20 的 1x SSC 中而浓度为 1 $\mu$ g/mL。取 100 $\mu$ L 加入至各个井孔中, 孵化 15 分钟。然后将该微滴定盘以含有 0.1% Tween 20 的 1x SSC 清洗三次, 以 OPD-分析显示该信号。

#### OPD-分析:

制备包含: 6mL 的 0.1M pH=5.0 的柠檬酸盐缓冲液, 两片 2mg 的邻苯二胺(OPD)片剂(Kem-En-Tech, Copenhagen, Denmark)和 2.5 $\mu$ L 30% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的主-混合物。取 100 $\mu$ L 的主-混合物加入到各个反应槽, 并依据酶的活性孵化 1 至 30 分钟。以 100 $\mu$ L 0.5M 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止该分析和用 ELISA 读数器在  $\lambda = 492$  nm 下测量光学密度。

#### 结果:

结果显示于图 2-1 和图 2-2。

#### 结论:

根据本实验可得出以下结论: 杂交的严格性-甚至在高浓度的 GnHCl 下-与在没有 GnHCl 的缓冲液中所得出的结果一致。

使用 C8 捕捉探针, (非特异性)信号的明显增加直到竞争突变型靶分子的浓度高于 0.05 $\mu$ M 时才可观察得到。在该浓度下配对与错配的寡体的比例为 1:100。根据 GnHCl 的浓度当竞争性寡体的量在 0.2-0.5 $\mu$ M 时可以发现配对寡体与错配寡体(例如信号增加两倍)的比例相等。当 GnHCl 的浓度高达 4M 时才看到高严格性。在缓冲液中在配对寡体与错配的寡体的比例约为 1:600 时可发现相同的信号。换句话说, 发现信号与干扰的比例为 1:600。

使用 T8 捕捉探针, (非-特异性)信号的明显的增加一直到竞争性野生型靶分子的浓度高于 0.1 $\mu$ M 时才可观察到。在该浓度下配对寡体的与错配的寡体的比例为 1:20。任何数量的竞争性寡体, 未发现相同比例的配对寡体与错配寡体(例如信号增加两倍)。因此假设只有当配对与错配的寡体的比例大于 1:60 时才会出现相同的信号。换句话说, 发现信号与干扰的比例大于 1:60 (推测值较佳为 1:100)。

可得出结论: 在含有强离液剂如盐酸胍(GnHCl)的缓冲液中, 杂交可表现出足

够高的严格性，使得单一碱基区别出来。

### 实施例 3

#### GnSCN 使得柠檬酸钠和磷酸盐缓冲液中的杂交可进行并促使其进行

用于 RNA 制备的标准细胞溶解缓冲液通常是以柠檬酸钠缓冲液为基础，例如：Glisin (1974) 生物化学(Biochemistry) 13, 2633 和 Chirwin (1979) 生物化学(Biochemistry) 18, 5294。下列实验用来比较在含有基于柠檬酸钠或磷酸盐的缓冲液的硫氰酸胍(GnSCN)下的杂交的进行情况。

带有 5' 葡萄糖的经 LNA 修饰的寡体经 UV(紫外线)照射(参见表 3-1)共价固定于一微滴定盘的井孔，在与互补性靶 DNA 寡体的杂交分析中作为捕捉探针。杂交物可通过杂交混合物中所含的 5' 为生物素化的 DNA 检测探针进行检测。

表 3-1：研究的寡核苷酸

名称	EQ 数	SEQ ID NO	序列	特征
C8	EQ-3133	4	5'-AQ-tac atg tta tgc ttt GAC <sup>met</sup> C <sup>met</sup> GT GTg-3'	5' 葡萄糖修饰的 LNA
T8	EQ-3134	9	5'-AQ-tac atg tta tgc ttt GAC <sup>met</sup> TGT GTg-3'	5' 葡萄糖修饰的 LNA
野生型靶分子	EQ-3185	7	5'ttg aat tcc aag agc aca cgg tct tca gtg aag ctg cag ggc act tcc aa 3'	野生型，有意义 g/c pos. 9756 (50-mer)
突变型靶分子	EQ-3187	10	5'ttg aat tcc aag agc aca cag tct tca gtg aag ctg cag ggc act tcc aa 3'	有意义 a/t pos. 9756 (50-mer)
检测探针	EQ-3246	8	5'-生物素-ttg gaa gtg ccc tgc agc tt-3'	5' 生物素化的 DNA

注：LNA 单体以大写字母标识，DNA 单体以小写字母标识。C<sup>met</sup> 系指 5-甲基胞嘧啶 LNA 单体。5'-AQ 指该寡体带有 5' 葡萄糖(AQ)和 C3 接头接头，该组成系 AQ-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>- 寡体。5'-AQ-HEG 指该寡体 5' 端为 AQ-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-PO<sub>4</sub>-((CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O)<sub>5</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-寡体。5'-生物素指该寡体 5' 端为：生物素-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-寡体。

#### 固定 ApoB 捕捉探针：

将葡萄糖 LNA 捕捉探针(不论是 C8 或 T8-参见表 3-1)以 0.1 μM 的浓度溶于 0.2M NaCl 中。取 100 μL 寡体加入到各微滴定盘的井孔(C96 polysorp; Nalge Nunc International, Roskilde, Denmark)，在 ULS-20-2 照明器最大温度 35°C 时用温和的 UV 光(约 350nm)照射 15 分钟。该照明器配有 28 个飞利浦 Cleo 小型 25W-S 亮度灯管(14 个在样

品架玻璃板的上方, 14 个在下方); 本试验只使用上方的灯管。

孵化后, 先用 300 $\mu$ L 的含有 0.25% Tween 20(Riedel-de Häen, Seelze, Germany) 的 0.4M NaOH 清洗, 然后再用 300 $\mu$ L 去离子水清洗三次。

#### 与 WT (EQ-3185)和 MUT (EQ-3187)靶分子进行杂交:

将野生型(WT)靶分子(0.012 $\mu$ M)加入至覆有 C8 捕捉探针的微滴定盘的井孔中。杂交混合物中的 GnSCN 的浓度以二倍”稀释”变化-如下。所得的 GnSCN 的浓度为: 0.03, 0.06, 0.13, 0.25, 0.5, 1.2 和 4M。

相似地, 将突变型(MUT)靶分子(0.012 $\mu$ M)加入至覆有 T8 捕捉探针的井孔中, 并在 0.03, 0.06, 0.13, 0.25, 0.5, 1.2 和 4M 的 GnSCN 下进行杂交。

将固体 GnSCN 溶解至 pH 7, 含有 0.5% Sarcosyl 的 40mM 柠檬酸钠缓冲液中; 或 pH7, 含有 0.1% 的 Tween 20 的 50mM 磷酸盐缓冲液中, GnSCN 的最终浓度为 4M。含有较低浓度的 GnSCN 缓冲液是通过用含有 0M GnHCl 的成分相似的缓冲液稀释含有 4M GnSCN 的缓冲液而获得。

取 100 $\mu$ L 的杂交混合物加入每个微滴定盘的井孔中。捕捉寡体和靶寡体在 37 °C下进行半小时的杂交。然后以 300 $\mu$ L 的含有 0.1% Tween 20 的 1x SSC 清洗该井孔 5 次(1x SSC 系 150mM NaCl, 15mM 柠檬酸钠)。最后, 将溶于含有 0.1% Tween 20 的 1x SSC 的检测探针(EQ-3246, SEQ ID NO 8)100 $\mu$ L 0.12 $\mu$ M 加入, 并在 37°C 下进行半小时的杂交。然后以含有 0.1% Tween 20 的 1x SSC 清洗该微滴定盘三次。

该杂交物通过链菌素-辣根过氧化物酶(strA-HRP)连接至生物素检测探针而进行检测。将该 strA-HRP(Pierce, Rockford, IL, USA. Cat no. 21126) 以浓度为 1 $\mu$ g/mL 溶于含有 0.1% Tween 20 的 1x SSC 中。取 100 $\mu$ L 加入至各个井孔中, 孵化 15 分钟然后用含有 0.1% Tween 20 的 1x SSC 清洗该微滴定盘三次, OPD-分析显示该信号。

#### OPD-分析:

制备包含: 6mL pH=5.0 的 0.1M 柠檬酸盐缓冲液, 两片 2mg 的邻苯二胺(OPD)片剂(Kem-En-Tech, Copenhagen, Denmark)和 2.5 $\mu$ L 30% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的主混合物。取 100 $\mu$ L 的主混合物加入到各个反应槽, 根据酶的活性孵化 1 至 30 分钟。用 100 $\mu$ L 0.5M 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止该分析, 并在  $\lambda = 492$  nm 下用 ELISA 读数器测量光学密度。

#### 结果:

结果显示于图 3-1。

#### 结论:

发现杂交信号作为 GnSCN 浓度的函数而增加, 在约 0.2M 时开始起作用, 在约 1M 到 2M 的间最为理想。

在基于磷酸盐的缓冲液中进行 C8 捕捉 LNA 探针与 WT 靶寡体的杂交可发现 GnSCN 的存在有最显著的增强效果。在 GnSCN 最佳浓度时信号增强 75%。

T8 与 MUT 寡体的杂交受 GnSCN 的影响较少。在磷酸盐缓冲液中, 高浓度的

GnSCN(4M)具有负面的影响。

可得出结论：基于柠檬酸钠的缓冲液，例如许多用于细胞溶解-缓冲液的类型至少与基于磷酸盐的缓冲液一样好，GnSCN，与盐酸胍(GnHCl)相似，在高浓度时使得并加强杂交的进行。

#### 实施例 4

##### 在 GnSCN 中比较柠檬酸钠和磷酸盐缓冲液中的杂交的特异性(竞争实验)

下列实验用来比较在含基于柠檬酸钠或磷酸盐的缓冲液的硫氰酸胍(GnSCN)溶液中杂交的严格性。

将带有 5'葱醍的经 LNA 修饰的寡体(参见表 2-1)经 UV(紫外线)照射共价固定于一微滴定盘的井孔，在与互补性靶 DNA 寡体的杂交分析中作为捕捉探针。该杂交物通过杂交混合物中含有的 5'生物素化的 DNA 检测探针进行检测。

表 4-1：研究的寡核苷酸

名称	EQ 数	SEQ ID NO	序列	特征
C8	EQ-3133	4	5'-AQ-tac atg tta tgc ttt GAC <sup>met</sup> <u>C</u> <sup>met</sup> GT GTg-3'	5'葱醍修饰的 LNA
T8	EQ-3134	9	5'-AQ-tac atg tta tgc ttt GAC <sup>met</sup> <u>T</u> GT GTg-3'	5'葱醍修饰的 LNA
野生型靶分子	EQ-3185	7	5'ttg aat tcc aag agc aca cgg tct tca gtg aag ctg cag ggc act tcc aa 3'	野生型，有意义 g/c pos. 9756 (50-mer)
突变型靶分子	EQ-3187	10	5'ttg aat tcc aag agc aca cag tct tca gtg aag ctg cag ggc act tcc aa 3'	有意义 a/t pos. 9756 (50-mer)
检测探针	EQ-3246	8	5'-生物素-ttg gaa gtg ccc tgc agc tt-3'	5'生物素化的 DNA

注：LNA 单体以大写字母标识，DNA 单体以小写字母标识。C<sup>met</sup>指单体是 5-甲基胞嘧啶 LNA。5'-AQ 指该寡体带有 5'葱醍(AQ)和 C3 接头，该组成为 AQ-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-寡体。5'-生物素指该寡体 5'端为：生物素-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-寡体。

##### 固定 ApoB 捕捉探针：

将葱醍 LNA 捕捉探针(不论是 C8 或 T8-参见表 4-1)c 浓度为 0.1μM 溶于 0.2M NaCl 中。取 100μL 寡体加入到各微滴定盘的井孔(C96 polysorp; Nalge Nunc International, Roskilde, Denmark)，并在 ULS-20-2 照明器最大温度 35℃时用温和的

UV 光(约 350nm)照射 15 分钟。该照明器配有 28 个菲利浦 Cleo 小型 25W-S 亮度灯管(14 个在样品架玻璃板的上方, 14 个在下方); 本试验只使用上方的灯管。

孵化后先以 300 $\mu$ L 含有 0.25% Tween 20(Riedel-de Häen, Seelze, Germany)的 0.4M NaOH 清洗, 然后再以 300 $\mu$ L 去离子水清洗三次。

#### 与野生型靶分子(EQ-3185)和突变型靶分子(EQ-3187)进行杂交:

将野生型靶分子(EQ3185, SEQ ID NO 7)以恒定的低浓度(0.0005 $\mu$ M)加入至覆有 C8 捕捉探针(EQ 3133, SEQ ID NO4)的微滴定盘的井孔中, 而竞争性单一碱基错配突变型靶分子(EQ3187, SEQ ID NO 10)的量以五倍“稀释系列”变化。所得到的突变型靶分子的浓度为: 0.0001, 0.0005, 0.0025, 0.012, 0.06 和 0.30 $\mu$ M。

将突变型靶分子以恒定的低浓度(0.005 $\mu$ M)加入至覆有 T8 捕捉探针(EQ 3134, SEQ ID NO 9)的井孔中, 而竞争性单一碱基错配野生型靶分子(EQ3185, SEQ ID NO 7)的量以五倍“稀释系列”变化。所得到的野生型靶分子的浓度为: 0.0001, 0.0005, 0.0025, 0.012, 0.06 和 0.30 $\mu$ M。

将固体的 GnSCN 溶解于 pH 7, 含有 0.5% Sarcosyl 的 40mM 柠檬酸钠缓冲液; 或于 pH7, 含有 0.1% 的 Tween 20 的 50mM 磷酸盐缓冲液中, GnSCN 最终为 4M, 制得杂交缓冲液。含有较低浓度的 GnSCN 缓冲液以含有 0M GnHCl 的相似成分的缓冲液稀释含有 4M GnSCN 的缓冲液而得到。

取 100 $\mu$ L 的杂交混合物加入到每个微滴定盘的井孔中。捕捉寡体和靶寡体在 37°C 下进行半小时的杂交。然后以含有 0.1% Tween 20 的 300 $\mu$ L 的 1xSSC 清洗该井孔 5 次(1x SSC 系 150mM NaCl, 15mM 柠檬酸钠)。然后, 将溶于含有 0.1% Tween 20 的 1x SSC 的检测探针(EQ-3246, SEQ ID NO 8)100 $\mu$ L 0.12 $\mu$ M 加入, 并在 37°C 下进行半小时的杂交。最后以含有 0.1% Tween 20 的 1x SSC 清洗该微滴定盘三次。

该杂交物通过链霉抗生物素-辣根过氧化物酶(strA-HRP)连接至生物素化的检测探针而进行检测。该 strA-HRP(Pierce, Rockford, IL, USA. Cat no. 21126)溶于含有 0.1% Tween 20 的 1x SSC 中而得到浓度为 1 $\mu$ g/mL, 取 100 $\mu$ L 加入至各个井孔中孵化 15 分钟。然后以含有 0.1% Tween 20 的 1x SSC 清洗该微滴定盘三次, 以 OPD-分析, 显示该信号。

#### OPD-分析:

制备包含: 6mL 的 0.1M 柠檬酸盐缓冲液 pH=5.0, 两锭 2mg 的邻苯二胺(OPD)片剂(Kem-En-Tech, Copenhagen, Denmark)和 2.5 $\mu$ L 30% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的主-混合物。取 100 $\mu$ L 的主混合物加入到各个反应槽, 根据酶的活性孵化 1 至 30 分钟。以 100 $\mu$ L 0.5M 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止该分析, 用 ELISA 读数器在  $\lambda$ =492 nm 下测量光学密度。

#### 结果:

结果显示于图 4-1, 4-2, 4-3 和 4-4。

#### 结论:

根据本实验的结果可得出以下结论: 杂交的严格性-甚至在高浓度的 GnSCN 下

-与缓冲液中不含 GnSCN 时所发现的结果一致。进一步得出结论，该严格性在以柠檬酸钠和以磷酸盐为基础的缓冲液中是一致的。

使用 C8 捕捉探针时，(非-特异性)信号的显著增加直到竞争的突变型靶分子的浓度大于  $0.05\mu\text{M}$  时才出现。在该浓度下配对寡体与错配的寡体的比例为 1:100。除了在 4M GnSCN, PO<sub>4</sub>-缓冲液中的 C8 的杂交，在任何竞争性寡体量变化的情况下未发现相等比例的配对与错配寡体所显现的信号(例如信号增加两倍)杂交。当 C8 的杂交在 4M GnSCN, PO<sub>4</sub> 下进行时，在约  $0.15\mu\text{M}$  时获得相同的信号，表明信号与干扰的比例约为 300。其余的杂交中，信号与干扰的比例比 1:600 更好。

使用 T8 捕捉探针，(非-特异性)信号的显著增加直到竞争性野生型靶分子的浓度超过  $0.1\mu\text{M}$  才出现。在该浓度下配对与错配的寡体的比例为 1:20。在任何竞争性寡体的量变化时未发现相等比例的配对与错配寡体所显现的信号(例如信号增加两倍)。因此假定只有当配对寡体与错配的寡体的比例大于 1:60 时才会发现相等的信号。换句话说，发现信号与干扰的比例大于 1:60。

杂交的严格性在基于柠檬酸钠或磷酸盐的缓冲液中几乎相同。然而，在基于柠檬酸钠的缓冲液中获得了较高的杂交信号。

得出结论为：在含有强离液剂如硫氰酸胍(GnSCN)的缓冲液硫氰酸胍中的杂交可表现出足够高的严格性使得可检测出单一碱基的不同和基于柠檬酸钠或磷酸盐的缓冲液皆可使用。

## 实施例 5

### 含有盐酸胍的缓冲液中 DNA 和 LNA 寡核苷酸的热稳定性

所有-DNA 和 LNA 修饰的寡核苷酸的热稳定性用配有热调节 Peltier 组件 (Perkin Elmer, UV Lambda 40) 的分光光度计来分光光度确定。所制备的 1mL 的杂交混合物含有两种不同的缓冲液中的任意一种(4M GnHCl 在 50mM Na-PO<sub>4</sub>， pH 6.8, 0.1mM EDTA 中；或 50mM Na-PO<sub>4</sub>， pH 6.8, 115mM NaCl, 0.1mM EDTA) 和等摩尔 ( $1\mu\text{M}$ )量的 LNA 修饰的寡核苷酸和其互补或错配 DNA 寡核苷酸。用未修饰的寡核苷酸制备相同的杂交混合物作为参考实验。

在加热器中将各样品在微量离心管(eppendorf tube)中加热至 90°C，然后关掉加热器使其温度慢慢降至室温。将样品转移到 500  $\mu\text{L}$  的石英管中(Perkin Elmer)。再以 UV Lambda 40 的分光光度计测量该样品。以 260nm 的波长测量该样品，同时每分钟温度升高 1°C。于是得到作为熔化曲线的第一导数的 Tm 值。表 5-2 总结其结果。表 5-1 总结了所使用的寡体。

表 5-1: 研究的寡核苷酸

名称	EQ 数	SEQ ID NO	序列	特征
112T	EQ-3485	11	5'-C <sup>met</sup> GC <sup>met</sup> AC <sup>met</sup> AC <sup>met</sup> Gt-3'	LNA
as112t	EQ-3493	12	5'-acg tgt gcg-3'	LNA
as112c	EQ-3495	13	5'-acg tgc gcg-3'	所有 DNA
158T	EQ-3489	14	5'-GGC <sup>met</sup> AC <sup>met</sup> TTC <sup>met</sup> t-3'	LNA
as158t	EQ-3497	15	5'-aga agt gcc-3'	LNA
as158c	EQ-3499	16	5'-aga agc gcc-3'	所有 DNA

注: LNA 单体以大写字母标识, DNA 单体以小写字母标识。C<sup>met</sup> 指 5-甲基胞嘧啶 LNA 单体。

结果:

表 5-2 显示在含有盐酸胍的缓冲液中 DNA 和 LNA 寡核苷酸的热稳定性。

表 5-2

含下列物质的杂交缓冲液中 Tm			
寡体对	匹配	165mMNa <sup>+</sup>	4MGnHCl
LNA(EQ3485):DNA(EQ3493)	完全配对	73.8°C	65.4°C
LNA(EQ3485):DNA(EQ3495)	一个错配	51.5°C (Δ Tm22.3°C)	41.1°C (Δ Tm24.3°C)
LNA(EQ3489):DNA(EQ3497)	完全配对	69.9°C	61.2°C
LNA(EQ3489):DNA(EQ3499)	一个错配	47.0°C (Δ Tm22.9°C)	33.2°C (Δ Tm28.0°C)

注: Δ Tm 指完全配对的 LNA:DNA 异源双链与所讨论的双链核苷酸的 Tm 的差值。

结论:

由实验结果可得出结论: 杂交可发生在含有高浓度的强离液剂的缓冲液中。

当将单一错配碱基引入到靶 DNA 寡核苷酸中时, LNA:DNA 异源双链的 Tm 值明显下降。该结果指出 Tm 值的变化在含有盐酸胍的缓冲液中比在标准缓冲液更为明显, 所以含有强离液剂的杂交缓冲液有助于杂交对单一碱基的区分。

**实施例 6**

**通过 PCR 产物与 LNA 捕捉寡体的杂交检测单一碱基的多态性**

第一步是测试在复杂的生物样品中可否检测到特定的序列, 于是进行下列实验。

PCR 的产物是比所添加的合成的 50'mer 的模板更为复杂, 且其会增加杂交过

程的艰难度。为测试在离液序列高的缓冲液中所进行的杂交是否具有充分的识别力及敏感度,于是在含有野生型或突变型的 ApoB3500 各种模板上进行 PCR 反应,并且用 LNA 杂交分析测试。该分法由 5' 蔗醣固定的 LNA 修饰的寡体(参见表 6-1)作为捕捉探针和 PCR 产物作为互补的靶 DNA 寡体而构成。该杂交物以链霉抗生素除-辣根过氧化物酶(strA-HRP)连接至生物素化的 PCR 产物的末端,然后以 OPD 分析显示其结果。

表 6-1: 应用的寡核苷酸

名称	EQ 数	SEQ ID NO	序列	特征
C8	EQ-3133	4	5'-AQ-tac atg tta tgc ttt GAC <sup>met</sup> C <sup>met</sup> GT GTg-3'	5' 蔗醣修饰的 LNA
T8	EQ-3134	9	5'-AQ-tac atg tta tgc ttt GAC <sup>met</sup> TGT GTg-3'	5' 蔗醣修饰的 LNA
正向引物	EQ3198	17	5'-生物素-cta gtg agg cca aca ctt act tga att cca aga gc-3'	5' 生物素化的 DNA 引物, 有意义 (35-mer)
反向引物	EQ3213	3	5'-gtt ttt cgt act gtg ctc cca gag-3'	DNA 引物, 有意义 (24-mer)

注: LNA 单体以大写字母标识, DNA 单体以小写字母标识。C<sup>met</sup> 系指 5-甲基胞嘧啶 LNA 单体。5'-AQ 指该寡体带有 5' 蔗醣(AQ)和 C3 接头, 该组成为 AQ-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-寡体。5'-生物素指该寡体 5' 端为: 生物素-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-寡体。

表 6-2: 模板

样品	来源	特征
HCV29	人 DNA	ApoB35000, 野生型, 有意义 g/c pos. 9756
T112C1	人 DNA	ApoB35000, 野生型, 有意义 g/c pos. 9756
T112D1	人 DNA	ApoB35000, 野生型, 有意义 g/c pos. 9756
“A-等位基因”-质粒	质粒	ApoB35000, 野生型, 有意义 a/t pos. 9756

注: 基于这些全部的 DNA 或质粒的制备中所使用的正向和反向引物, 所预期的 PCR 扩增片段长度为 167 bp 且在有意义的单链上其 5' 端生物素化。

#### 引物的合成与分析:

以由商业来源的 HPLC 纯化的寡体得到 DNA 引物(DNA Technology, Aarhus, Denmark)。

#### 样品的制备

##### 1) 人类基因组 DNA:

人类基因组 DNA 以标准的苯酚萃取方式从三种不同的人类癌症细胞系中分离出来(Sambrook 等人(1989) Molecular Cloning, 第二版冷泉港实验室出版, 冷泉港, NY): HCV29, T112C1, T112D1(Skouv 等人(1989) Mol Carcin. 2, 59-62), 这些癌症细胞系相对于 ApoB3500 多态性(Ludwig 等人(1987) DNA 6:363-372; 编号 M19828)为野生型。

##### 2) "A-等位基因"-质粒:

使用用于哺乳动物血液的 DNA 分离试剂盒(Roche Molecular System 编号 1 667 327 Roche Molecular Biochemicals, Hvidovre, Denmark)将人类基因组 DNA 从 5mL 的全血中分离出来, 且仔细地依照厂商所提供的建议进行实验。

ApoB 基因的"A-等位基因"由含有 ApoB3500 所在的野生型人类的 ApoB 基因以 PCR-扩增反应而得。该 PCR 片段使用 TOPO™ 克隆® 试剂盒(Invitrogen, 编号 K4500-01, Invitrogen Corporation, Carlsbad CA USA)将该片段克隆至 pCR® 2.1-TOPO 质粒中。质粒 DNA 使用 QUIAGEN® 质粒试剂盒(QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)自细菌培养基中纯化出来。所插入的 DNA 序列使用 ALFexpress II DNA 分析系统进行确认, 且仔细地依照厂商所提供的建议进行实验。

#### 样品的 PCR 制备:

用于 6 个反应的 PCR 主-混合物:

148.50μL H<sub>2</sub>O

30μL 10xAmpliTaq 冷缓冲液(Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CY, USA)。

18μL MgCl<sub>2</sub> (25mM)

30μL dNTP (2mM)

30μL 正向引物 EQ3198 (SEQ ID NO 17) (10μM)

30μL 反向引物 EQ3213 (SEQ ID NO 3) (10μM)

1.5μL AmpliTaq Gold® DNA 聚合酶 (5U/μL) (Perkin-Elmer 编号 N808-0240, Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CY, USA)。

#### PCR 扩增:

在 0.5mL 薄-壁管中使用 Eppendorf Master-cycler Gradient thermocycler (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Germany)进行 PCR 反应。往该管中 48μL 的主-混合物中加入 2μL 的样品。

热循环:

变性: 94°C, 15 分钟  
 扩增(30 个循环): 94°C, 40 秒; 56°C, 40 秒; 72°C, 40 秒  
 延长: 72°C, 1 分钟  
 终止: 4°C, ∞

检测:

接着以标准的胶体电泳在 2% 的琼脂糖胶体上(LE, 分析级; Promega Corporation, Madison, USA)来分析 PCR 产物, 该琼脂糖胶体包括在胶体中以 1:30.000 比例稀释的 GelStar®(FMC BioProducts, Rockland, ME, USA)和 1x Tris-醋酸盐/ EDTA 电泳缓冲液(0.04M Tris-醋酸盐; 0.001M EDTA)。从各 PCR 反应中取 5μL 的产物并加入 1μL 的 6x 装载缓冲液(40% 蔗糖, 0.25% 溴苯酚蓝, 0.25% 二甲苯苯胺, 0.1M EDTA pH 8.0)。该胶体在稳定的电压下以 7V/cm 电泳约一小时。

为保存永久纪录, 利用合适的 UV-透照器(Model TM-20E UV Product, Upland, CA, USA)和滤光镜(Kodak Wratten #9 Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA)以标准的 Polaroid (Polaroid LTD., St. Albans, UK)对胶体进行拍照。

固定 ApoB 捕捉探针:

将葱醍 LNA 捕捉探针(不论是 C8 或 T8-参见表 6-1)溶于 0.2M NaCl 中寡体的而使其浓度为 0.1μM。取 100μL 加入到各微滴定盘的井孔(C96 polysorp; Nalge Nunc International, Roskilde, Denmark), 用 ULS-20-2 照明器在最大温度 35°C 时用温和的 UV 光(约 350nm)照射 15 分钟。该照明器配有 28 个菲利浦 Cleo 小型 25W-S 亮度灯管(14 个在样品架玻璃板的上方, 14 个在下方); 本试验只使用上方的灯管。

孵化后先以 300μL 含有 0.25% Tween 20(Riedel-de Häen, Seelze, Germany)的 0.4M NaOH 清洗井孔, 再以 300μL 去离子水清洗三次。

与 PCR 反应物进行杂交:

取 5μL 的 PCR 反应的产物加上 95μL 的 2M GnSCN 柠檬酸钠缓冲液加入至固定有 C8 或 T8 捕捉探针的腔中, 然后于 37°C 孵化半小时。

杂交缓冲液是 2M GnSCN 在 pH 7, 含有 0.5% Sarcosyl 的 40mM 柠檬酸钠缓冲液中的溶液。

杂交完成后, 以 300μL 含有 0.1% Tween 20 的 1x SSC (1x SSC 系 150mM NaCl, 15mM 柠檬酸钠)清洗该微滴定盘五次。

该杂交物以链霉抗生物素-辣根过氧化物酶(strA-HRP)连接至生物素化的检测探针而检测的。该 strA-HRP(Pierce, Rockford, IL, USA. Cat no. 21126)溶于含有 0.1% Tween 20 的 1x SSC 中而使其浓度为 1μg/mL, 取 100μL 加入至各个井孔中且孵化 15 分钟。然后以含有 0.1% Tween 20 的 1x SSC 清洗该微滴定盘三次, 以 OPD-分析显示该信号。

### OPD-分析:

制备包含: 6mL pH=5.0 的 0.1M 柠檬酸盐缓冲液, 两片 2mg 的邻苯二胺(OPD)片剂(Kem-En-Tech, Copenhagen, Denmark)和 2.5μL 30% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的主-混合物。取 100μL 的主-混合物加入到各个反应槽, 根据酶的活性孵化 1 至 30 分钟。以 100μL 0.5M 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止该分析法, 用 ELISA 读数器在  $\lambda = 492$  nm 下测量光学密度。

### 结果:

结果显示于图 6-1。

### 结论:

在四个 PCR 反应中均可在 2M GnSCN 存在的情况下通过杂交检测到单一碱基的不同。如前所述的实施例所见的“A-等位基因”的捕捉探针(T8)的信号比用 C8 LNA 捕捉探针所得到的信号低, 然而在本实验中该信号非常清楚, 表明在 2M GnSCN 存在的情况下杂交十分严格。

## 实施例 7

### 细菌细胞的溶解物中质粒 DNA 的检测

为了研究本发明的杂交和萃取方法是否适用于核酸及非-核酸的复杂的生物混合物, 所以进行下列实验。

简单地说, 三种不同的细菌菌株(大肠杆菌 K12), 两种含有质粒和一种不含质粒的菌株(参见表 7-1), 经过培养, 溶解, 并在含有硫氰酸胍(GnSCN)的缓冲液中进行杂交以检测质粒。

表 7-1: 细菌菌株

菌株名	基因型	参考文献
NF1815	MC1000 <i>recA1</i>	Casadaban (1980) J.Mol.Biol.138, 179-207
TOP10/pCR	<i>FmcrA_(mrn-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>_80lacZ_M15_lac_74 recA1 deoR</i> <i>araD139_(ara-leu)</i> <i>7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1</i> <i>nupG/ pCR®2.1-TOPO</i>	Invitrogen, cat. No. K4500-01, Invitrogen Corporation, Carlsbad CA USA
TOP10/pApoBwt	<i>FmcrA_(mrn-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>_80lacZ_M15_lac_74 recA1 deoR</i> <i>araD139_(ara-leu)</i> <i>7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1</i> <i>nupG/ pApoBwt</i>	

### 克隆 ApoBwt 质粒

使用用于哺乳动物的血液的 DNA 分离试剂盒(Roche Molecular System 编号 1 667 327 Roche Molecular Biochemicals, Hvidovre, Denmark)将人类基因组的 DNA 从 5mL 的全血中分离出来, 且仔细地依照厂商所提供的建议进行实验。

ApoB 基因的“G-等位基因”由含有 ApoB3500 的野生型人类的 ApoB 基因以 PCR-扩增反应而得(Ludwig 等人(1987) DNA 6: 363-372; 编号 M19828, SEQ ID NO 1 和 SEQ ID NO 2)。该 PCR 片段系由 TOPO™ 克隆®试剂盒(Invitrogen, 编号 K4500-01, Invitrogen Corporation, Carlsbad CA USA) 将该片段克隆至 pCR®2.1-TOPO 质粒中。质粒 DNA 以 QIAGEN®质粒试剂盒(QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)自细菌培养基中纯化出来。所插入的 DNA 序列利用 ALFexpress II DNA 分析系统确认 DNA 序列且, 仔细地依照厂商所提供的建议进行实验。将所得到的质粒称为 pApoBwt。

含有 pCR®2.1-TOPO 质粒的 TOP10/pCR 菌株不插入任何 ApoB 基因。

#### 制备细菌的细胞溶解物

在摇动设备上, 于 37°C 下在含有 100μg/mL 的氨苄青霉素的 LB 介质(Sambrook 等人(1989) Molecular Cloning, 第二版冷泉港实验室出版, 冷泉港, NY)中过夜培养细菌。

第二天将细胞离心(15 分钟, 8000r/min), 然后再悬浮于 1/50 体积的 50mM Tris-Cl (pH 8)中。再将该细胞置于冰上以声波震荡 45 秒或每 2.5mL 的重新悬浮的细胞添加 0.250mL 100mg/mL 的溶菌酶, 再在室温下孵化 15 分钟。然后将该溶解的细胞保存于-20°C。

#### 检测

将带有 5'葱醍的 LNA 修饰的寡体(参见表 7-2)以 UV(紫外线)照射共价固定于一微滴定盘的井孔, 在与互补性靶 DNA 寡体的杂交分析中作为捕捉探针。该杂交物通过杂交混合物中含有 5'生物素化的 DNA 检测探针而检测的。

表 7-2: 研究的寡核苷酸

名称	EQ 数	SEQ ID NO	序列	特征
C11	EQ-3131	5	5'-AQ-tac atg tta tgc ttt AAG AC <sup>met</sup> <u>C</u> <sup>met</sup> GTG TGc-3'	5'葱醍修饰的 LNA
T11	EQ-3132	8	5'-AQ-tac atg tta tgc ttt AAG AC <sup>met</sup> <u>T</u> GTG TGc-3'	5'葱醍修饰的 LNA
检测探针	EQ3246	8	5'-生物素-ttg gaa gtg ccc tgc agc tt-3'	5'生物素化的 DNA

注: LNA 单体以大写字母标识, DNA 单体以小写字母标识。C<sup>met</sup> 系指 5-甲基胞嘧

啶 LNA 单体。5'-AQ 指该寡体带有 5' 葦酰(AQ)和 C3 接头，该组成为 AQ-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-寡体。5'-生物素指该寡体 5' 端为：生物素-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-寡体。

### 固定 ApoB 捕捉探针：

将蕙醌 LNA 捕捉探针(C11, T11-参见表 7-1)溶于 0.2M NaCl 中使其浓度为 0.1 $\mu$ M。取 100 $\mu$ L 寡体加入到各微滴定盘的井孔(C96 polysorp; Nalge Nunc International, Roskilde, Denmark), 使用 ULS-20-2 照明器在最大温度 35℃时用温和的 UV 光(约 350nm)照射 15 分钟。该照明器配有 28 个菲利浦 Cleo 小型 25W-S 亮度灯管(14 个在样品架玻璃板的上方, 14 个在下方); 本试验只使用上方的灯管。

孵化后先以含有 0.25% Tween 20(Riedel-de Häen, Seelze, Germany)300μL 的 0.4M NaOH 清洗井孔再以 300μL 去离子水清洗三次。

## 杂交:

将 50 $\mu$ L 的细菌细胞溶解物与 50 $\mu$ L(4M GnSCN, 25mM 柠檬酸钠, pH 7, 0.5% Sarcosyl)混合后加入至覆有 C8 或 T8 捕捉探针的微滴定盘的井孔中。使该混合物在 37°C 下孵化一整夜。

然后以 300 $\mu$ L 含有 0.1% Tween 20 的 1x SSC (1x SSC 系 150mM NaCl, 15mM 柠檬酸钠)清洗该微滴定盘五次。然后加入 100 $\mu$ L 0.12 $\mu$ M 的含有 0.1% Tween 20 的 1x SSC 的 检测探针, 使杂交于 37°C 进行一整夜, 然后以含有 0.1% Tween 20 的 1x SSC 清洗三次。

该杂交物以链霉抗生素素-辣根过氧化物酶(strA-HRP)连接至生物素化的检测探针而进行检测。该 strA-HRP(Pierce, Rockford, IL, USA. Cat no. 21126)溶于含有 0.1% Tween 20 的 1x SSC 中而使其浓度为 1 $\mu$ g/mL，取 100 $\mu$ L 加至各个井孔中且孵化 15 分钟。然后以含有 0.1% Tween 20 的 1x SSC 清洗该微滴定盘三次，以 OPD-分析显示该信号。

### OPD-分析：

制备包含: 6mL pH=5.0 的 0.1M 柠檬酸盐缓冲液, 两片 2mg 的邻苯二胺(OPD)片剂(Kem-En-Tech, Copenhagen, Denmark)和 2.5 $\mu$ L 30% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的主-混合物。取 100 $\mu$ L 的主-混合物加入到各个反应槽, 根据酶的活性孵化 1 至 30 分钟。以 100 $\mu$ L 0.5M 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止该分析, 用 ELISA 读数器在  $\lambda = 492$  nm 下测量光学密度。

## 结果：

结果显示于图 7-1。

## 结论：

由实验结果可得出结论：不论细菌是用超声处理还是以溶菌酶处理所得到溶解物中皆可捕捉到和检测到 pApoBwt 质粒。由于质粒是双-链，超螺旋的 DNA 分子，本实验表明在复杂的生物样品如粗制的细菌溶解物中可以检测到双-链，超螺旋的 DNA 分子。

序列表

<110> 埃克西库恩公司

<120> 以单一步骤制备和检测复合生物样品中的核酸

<130> 22642PC1

<160> 18

<170> Fast SEQ for Windows Version 3.0

<210> 1  
<211> 50  
<212> DNA  
<213> 智人

<400> 1  
cttacttgaa ttccaaagagc acacgggtctt cagtgaagct gcagggcact 50

<210> 2  
<211> 50  
<212> DNA  
<213> 智人

<400> 2  
cttacttgaa ttccaaagagc acacagtctt cagtgaagct gcagggcact 50

<210> 3  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成引物

<400> 3  
gtttttcgta ctgtgctccc agag 24

<210> 4  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成引物

<221> modified\_base  
<222> (16)...(23)  
<223> LNA

<221> modified\_base  
<222> (18)...(19)

<223> 5-甲基-胞嘧啶 LNA  
 <400> 4  
 tacatgttat gctttgaccg ttttg  
 <210> 5  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Sy人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成引物  
 <221> modified\_base  
 <222> (16)...(26)  
 <223> LNA  
  
 <221> modified\_base  
 <222> (20)...(21)  
 <223> 5-甲基-胞嘧啶 LNA  
 <400> 5  
 tacatgttat gcttaagac cgtgtgc  
 <210> 6  
 <211> 9  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成引物  
  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)...(9)  
 <223> LNA  
  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)...(1)  
 <223> 5'-hexaethylenglycol LNA  
  
 <221> modified\_base  
 <222> (4)...(4)  
 <223> 5-甲基-胞嘧啶 LNA  
  
 <400> 6  
 agaccgtgt  
 <210> 7  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> 智人  
  
 <400> 7  
 ttgaattcca agagcacacg gtcttcagtg aagctgcagg gcacttccaa  
 <210> 8

20  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成引物

<400> 8  
ttggaagtgc cctgcagctt 20

<210> 9  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成引物

<221> modified\_base  
<222> (16)...(23)  
<223> LNA

<221> modified\_base  
<222> (18)...(18)  
<223> 5-甲基-胞嘧啶 LNA

<400> 9  
tacatgttat gcttgactg tgtg 24

<210> 10  
<211> 50  
<212> DNA  
<213> 智人

<400> 10  
ttgaattcca agagcacaca gtcttcagtg aagctgcagg gcacttccaa 50

<210> 11  
<211> 9  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成引物

<221> modified\_base  
<222> (1)...(8)  
<223> LNA

<221> modified\_base  
<222> (1)...(1)  
<223> 5-甲基-胞嘧啶 LNA

<221> modified\_base

<222> (3)... (3)  
<223> 5-甲基-胞嘧啶 LNA

<221> modified\_base  
<222> (5)... (5)  
<223> 5-甲基-胞嘧啶 LNA

<221> modified\_base  
<222> (7)... (7)  
<223> 5-甲基-胞嘧啶 LNA  
<400> 11

cgcacacgt 9

<210> 12  
<211> 9  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成引物

<400> 12

acgtgtgca 9

<210> 13  
<211> 9  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成引物

<400> 13

acgtgcgcg 9

<210> 14  
<211> 9  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成引物

<221> modified\_base  
<222> (1)... (8)  
<223> LNA

<221> modified\_base  
<222> (3)... (3)  
<223> 5-甲基-胞嘧啶 LNA

<221> modified\_base  
<222> (5)... (5)  
<223> 5-甲基-胞嘧啶 LNA

<221> modified\_base  
<222> (8)...(8)  
<223> 5-甲基-胞嘧啶 LNA

<400> 14  
ggcacttct 9

<210> 15  
<211> 9  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成引物

<400> 15  
agaagtgcc 9

<210> 16  
<211> 9  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成引物

<400> 16  
agaagcgcc 9

<210> 17  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成引物

<400> 17  
ctagtggagc caacacttac ttgaattcca agagc 35

<210> 18  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成引物

<221> modified\_base  
<222> (16)...(26)  
<223> LNA

<221> modified\_base

<222> (20) .... (20)  
<223> 5-甲基-胞嘧啶 LNA

<400> 18

tacatgttat gcttaagac tgtgtgc

27

## 说 明 书 附 图

## 原理的说明

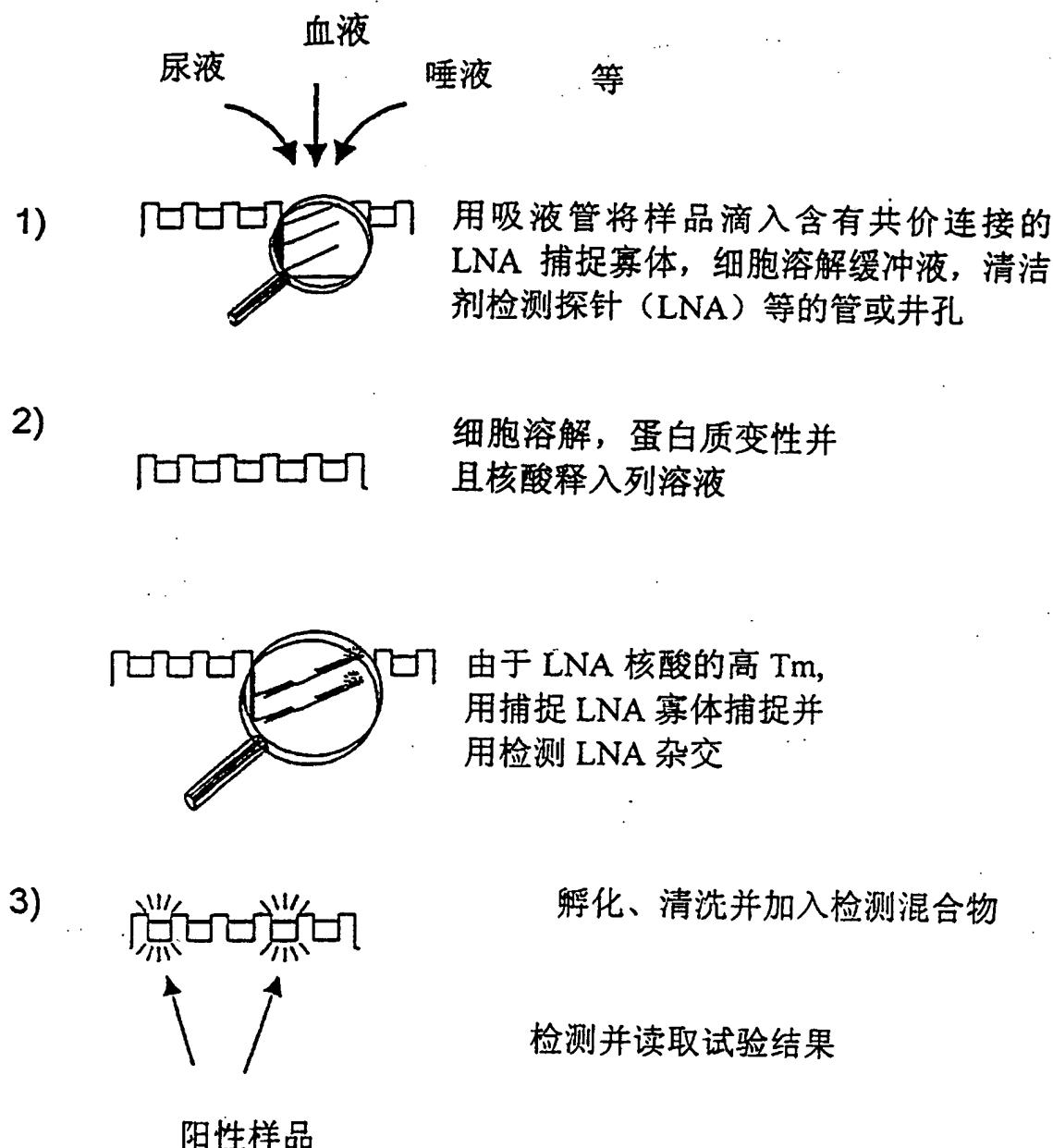


图 1

在 GnHCl 中杂交

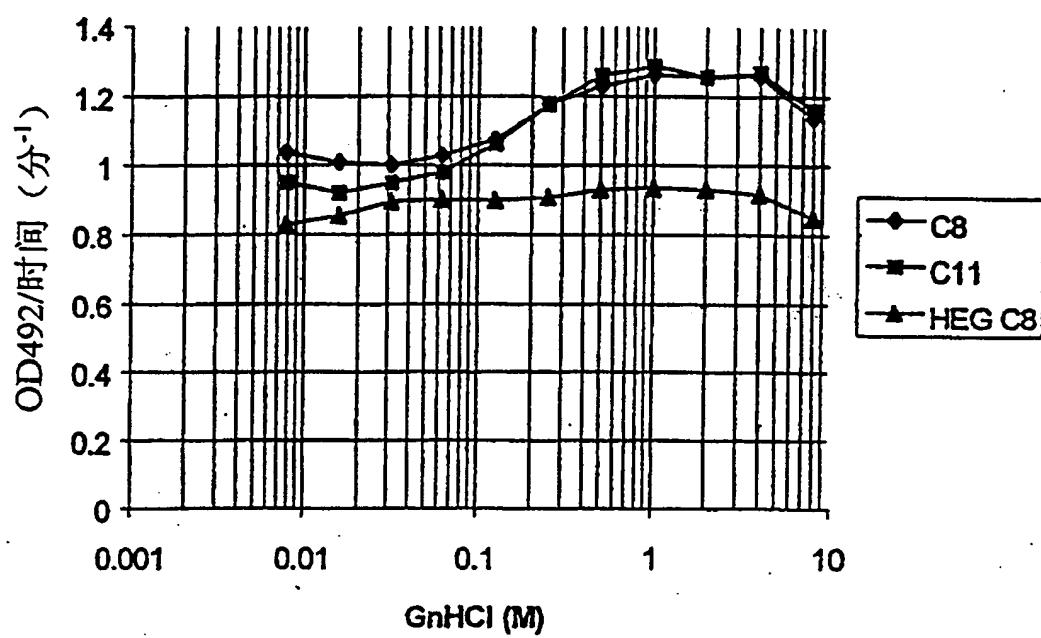


图 1-1

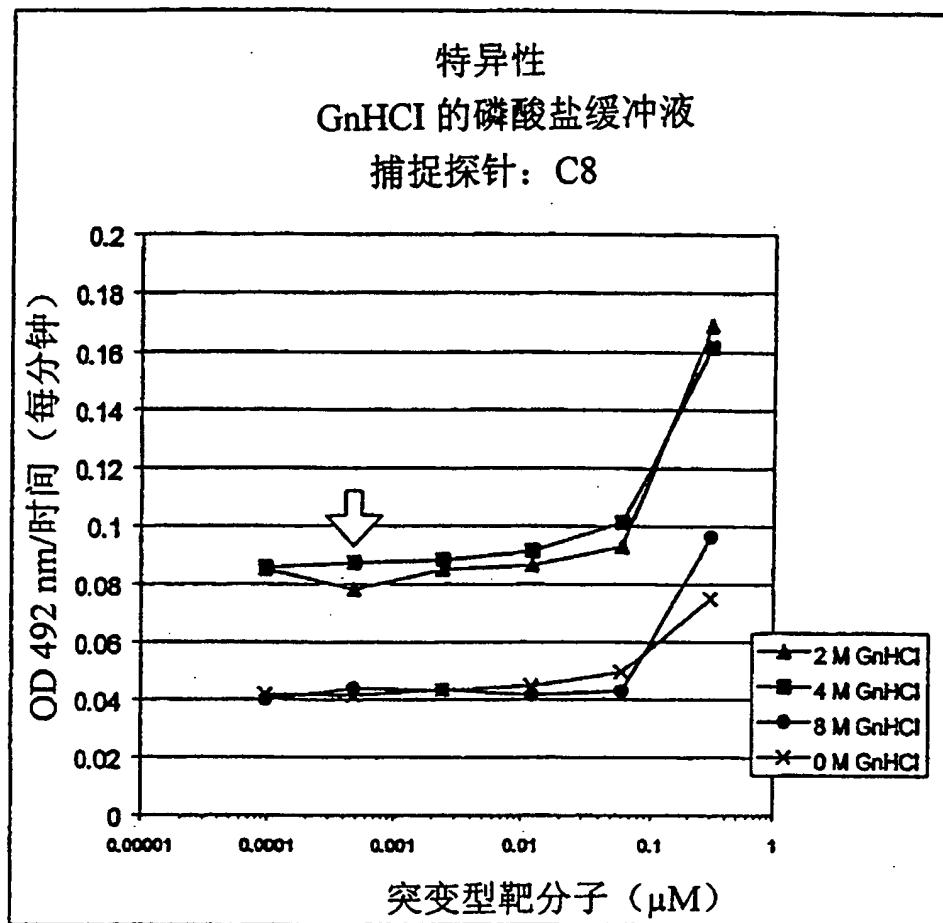


图 2-1

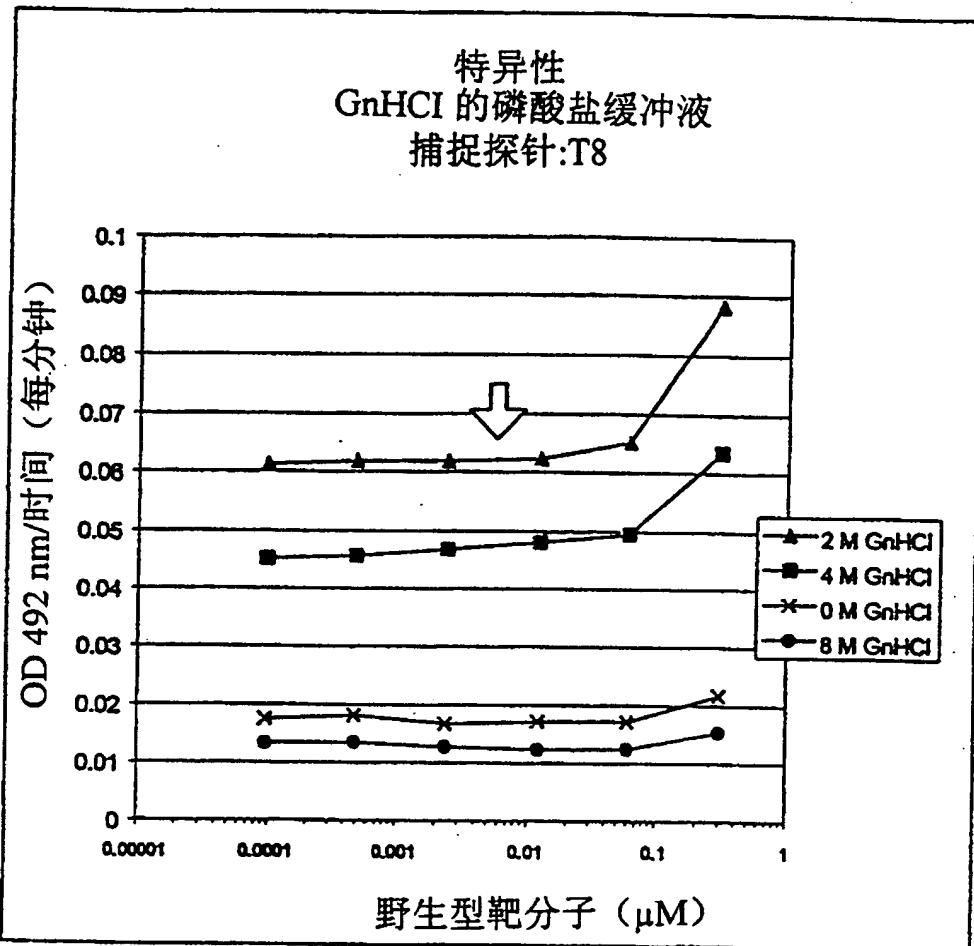


图 2-2

## 磷酸盐缓冲液&amp;柠檬酸钠缓冲液

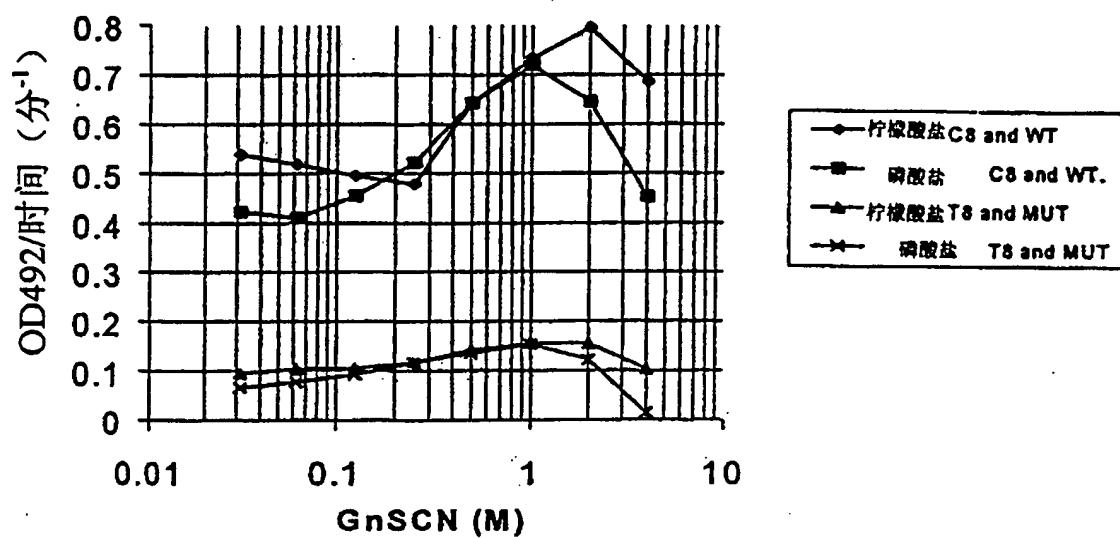


图 3-1

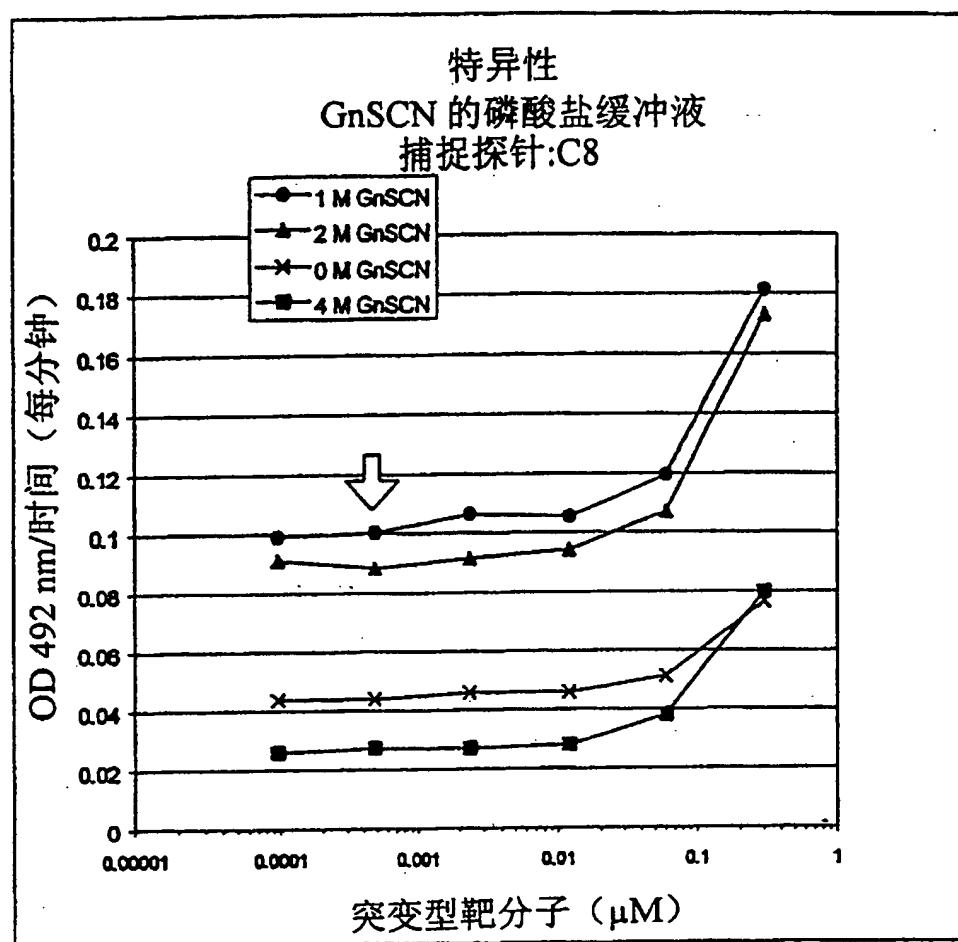


图 4-1

特异性  
GnSCN 的磷酸盐缓冲液  
捕捉探针:T8

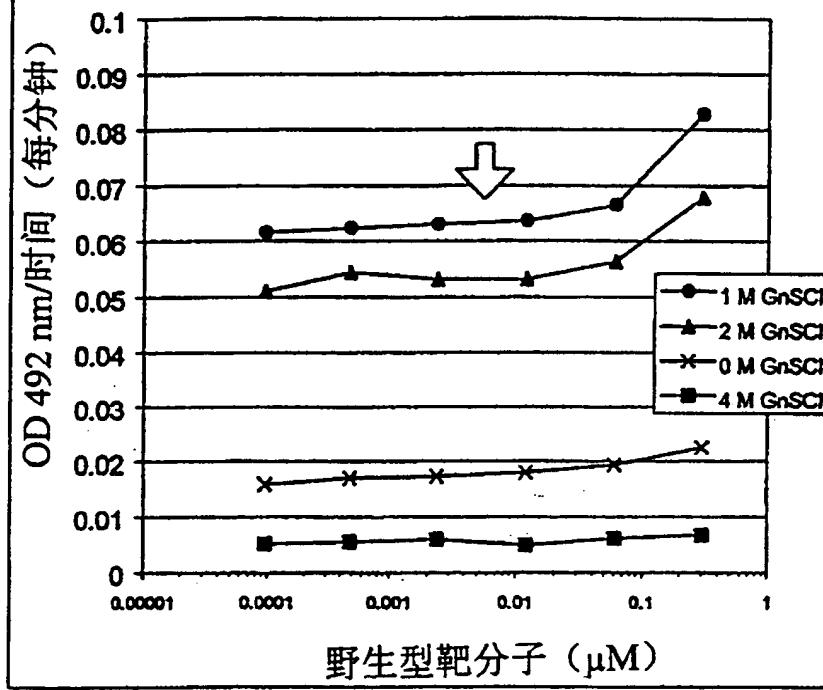


图 4-2

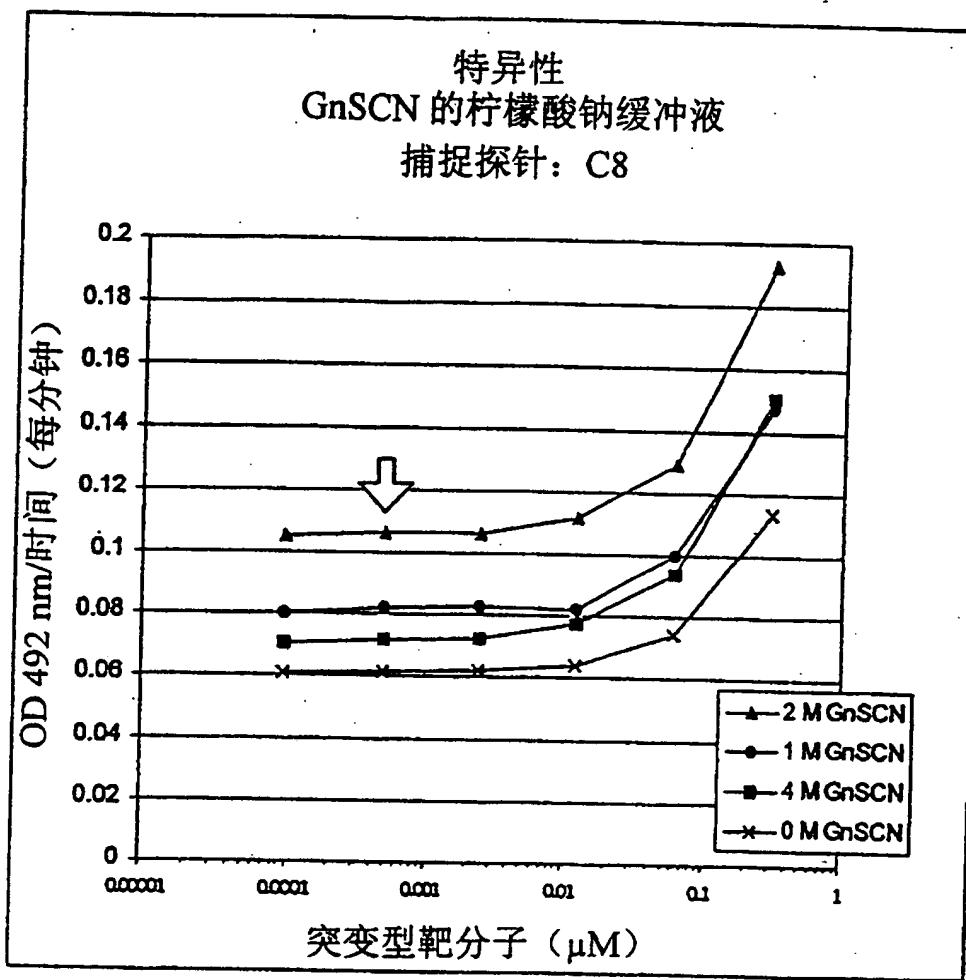


图 4-3

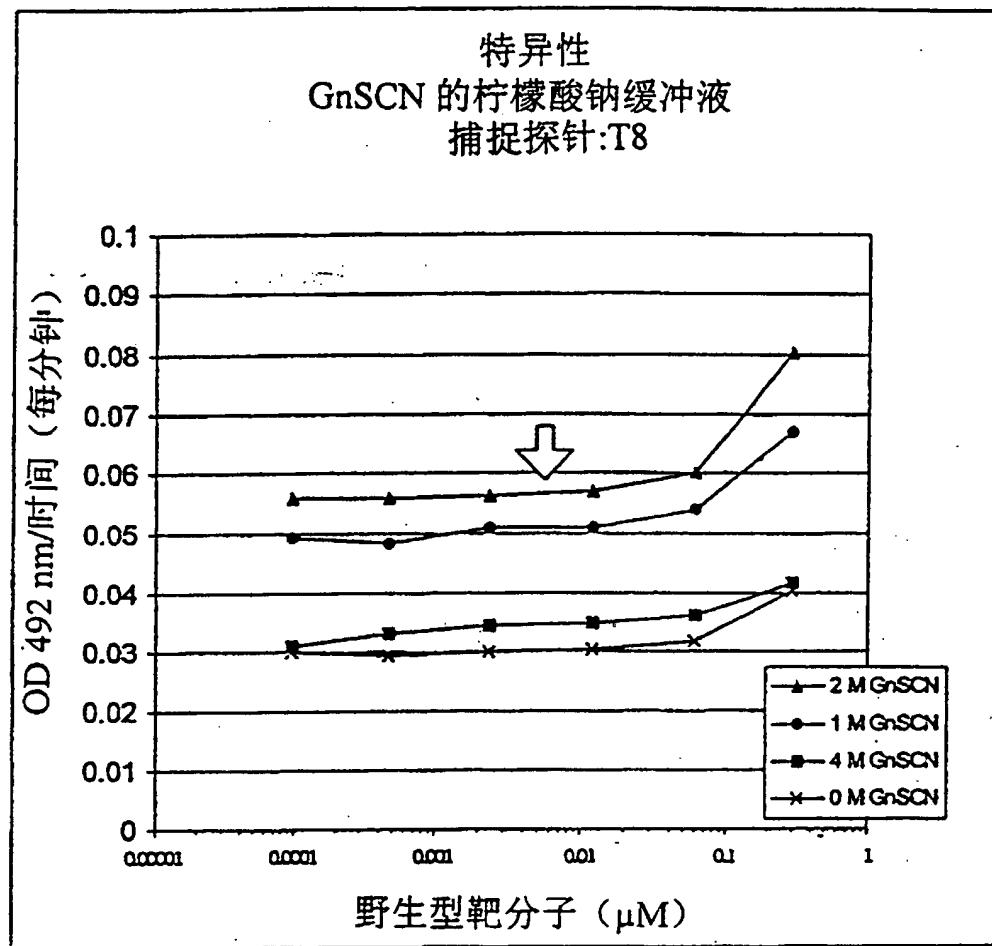


图 4-4

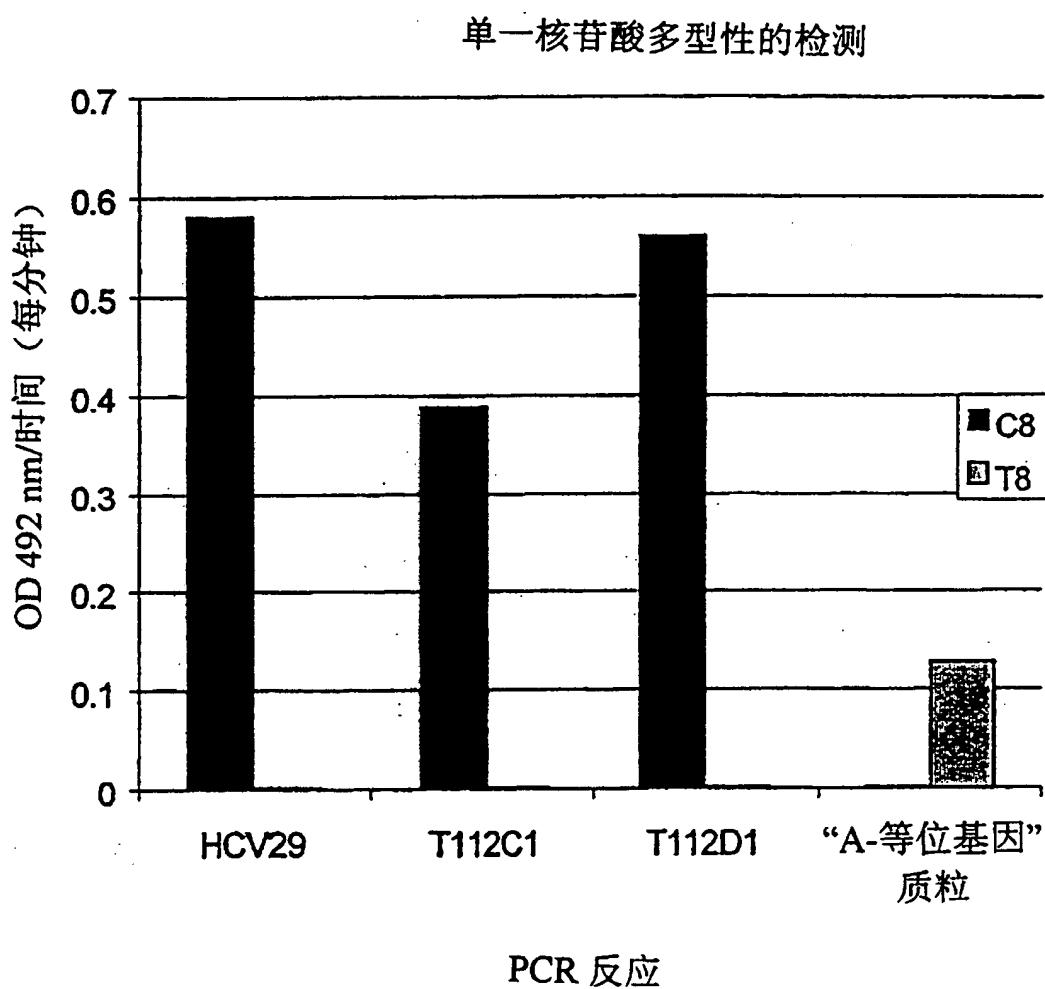


图 6-1

质粒检测

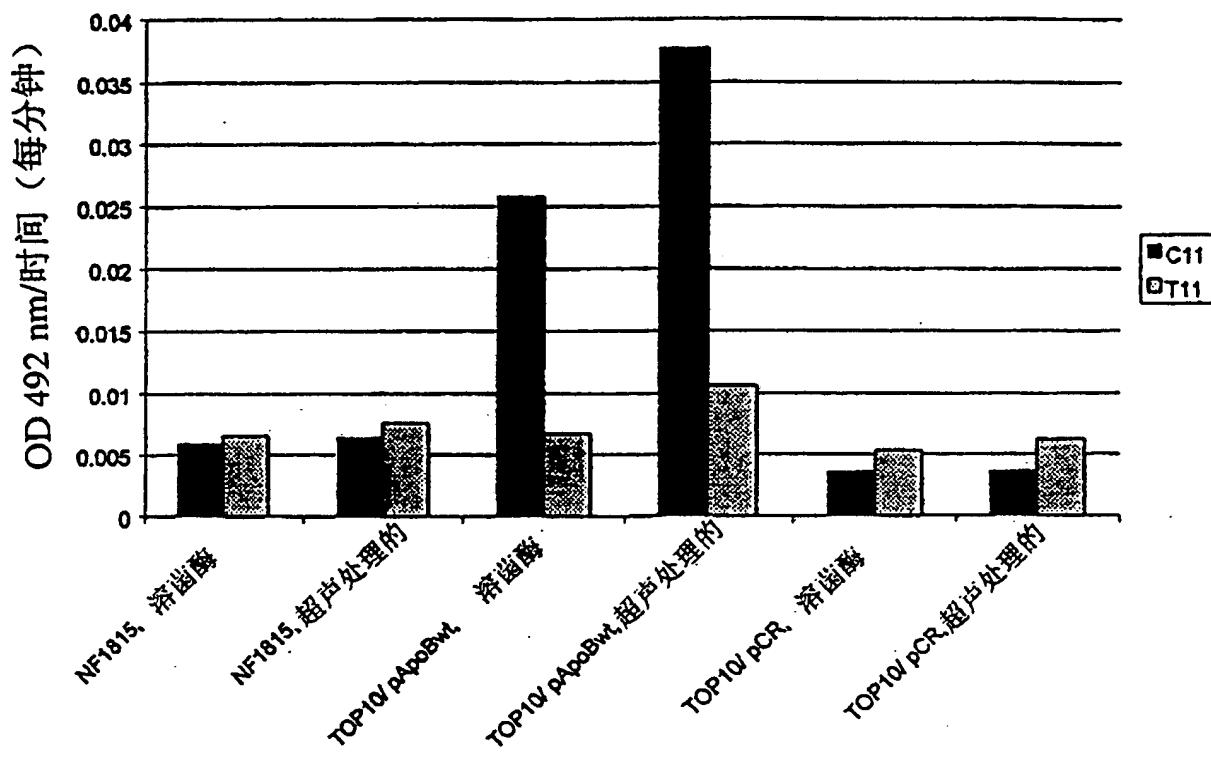


图 7-1